Vol. 16 1945

ARQUIVOS

DO

INSTITUTO BIOLOGICO

• Departamento da Defesa Sanitária da Agricultura •

IMPERIAL MYCOLOGICAL INSTITUTE
16 SEP 1946

SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

Os Arquivos do Instituto Biologico aparecem sob a forma de artigos separados publicados à medida de sua apresentação, os quais anualmente são reunidos em um volume, que pode ser adquirido por permuta ou compra pelo preço marcado na capa.

Os artigos separados, impressos em numero limitado, são obtidos apenas por permuta.

Toda correspondencia referente aos Arquivos deve ser dirigida ao Superintendenie do Instituto Biologico, (Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura) Caixa postal 119-A, São Paulo, Brasil.

Superintendente - Prof. Dr. H. da Rocha Lima.

The "Arquivos do Instituto Biologico" appear in the form of separate articles published as they are presented, and are annually united in one volume, which may be acquired by exchange or purchase at the price indicated on the cover.

The separate articles, a limited number of which is printed, may be obtained by exchange.

All correspondence referring to the "Arquivos" should be addressed to - Superintendente do Instituto Biologico, P. O. Box 119-A - São Paulo, Brazil.

PREÇO DESTE NUMERO CR $ 30,00

Vol. 16 1945

ARQUIVOS

DO

INSTITUTO BIOLOGICO

• Departamento da Defesa Sanitária da Agricultura •

SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

SUMÁRIO

Pags.

1. **Bueno, P.** — PESQUIZAS SÔBRE A PARALISIA DOS SUINOS — Estampas 1-3.
Researches on Swine Paralysis 1-14

2. **Nobrega, P. e R. C. Bueno** — A AÇÃO DA PENICILINA NA ESPIROQUETOSE AVIÁRIA.
On the Treatment of Avian Spirochaetosis with Penicillin . . 15-17

3. **Bitancourt, A. A.** — NOVAS ESPÉCIES SUL-AMERICANAS DO GÊNERO ELSINOË — Estampas 4-7.
New South-American Species of Elsinoë 19-26

4. **Toledo, A. A. de** — ESTUDOS ESTATÍSTICOS DA INFESTAÇÃO NUM CAFEZAL PELA BROCA "HYPOTHENEMUS HAMPEI (FERR., 1867)" (COL.-IPIDAE) — Com 2 figuras no texto.
Statistical Studies of the Infestation of a Coffee Plantation by the Coffee Berry Borer "Hypothenemus hampei (FERR., 1867)" *(Col.-Ipidae)* 27-39

5. **Pereira, C. e H. Medina** — VIRAGEM DA COLORAÇÃO POR UMA LACA FÉRREA DE HEMATEINA PELA PRATA AMONIACAL, PARA O ESTUDO DAS LEISHMANIAS, PRINCIPALMENTE NOS TECIDOS — Estampa 8.
Toning in the Ammoniacal Silver of the Staining by an Iron Hematein Lake, for the Study of Leishmaniae, specially in the Tissues 41-48

6. **Silberschmidt, K.** — OBSERVAÇÕES SUPLEMENTARES SÔBRE A TRANSMISSÃO EXPERIMENTAL DA "CLOROSE INFECCIOSA" DAS MALVÁCEAS — Estampas 9-12.
Supplementary Observations on the Experimental Transmission of the "Infectious Chlorosis" of Malvaceae 49-64

7. **Araujo, R. L.** — CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DO GÊNERO "METAPOLYBIA DUCKE, 1905" (HYM.-VESPIDAE) — Com 12 figuras no texto e estampas 13-14.
Contribution to the Knowledge of the Genus "Metapolybia DUCKE, 1905" *(Hym.-Vespidae)* 65-82

8. **Biocca, E. e P. Nobrega** — SÔBRE A QUIMIOTERAPIA DA TOXOPLASMOSE.
On the Therapeutic Effect of Sulfonamide Compounds against Toxoplasma Infection 83-88

9. **Monte, Oscar** — OBSERVAÇÕES BIOLÓGICAS SÔBRE "COELOSTERNUS GRANICOLLIS (PIERCE)", BROCA DA MANDIOCA — Com 1 figura no texto e estampas 15-16.
Biological Observations on "Coelosternus granicollis (PIERCE)", *a Pest of Cassava* 89-110

(CONTINUA)

Pags.

10. **Nobrega, P. e A. S. Reis** — SÔBRE O TEMPO DE APARECIMENTO E DURAÇÃO DA IMUNIDADE NOS EMBRIÕES E PINTOS DE GALINHAS VACINADAS CONTRA A ESPIROQUETOSE.
On the Immunity of Chicks and Chick Embryos from Hens Vaccinated against Fowl Spirochaetosis 111-114

11. **Rocha e Silva, M. & Sylvia O. Andrade** — ESTUDOS SÔBRE A DICOUMARINA-3,3'-METILENO*BIS* — (4-HIDROXICOUMARINA). II. EFEITO COAGULANTE DE VENENOS DOS GÊNEROS "BOTHROPS" E "CROTALUS" SÔBRE O PLASMA OXALATADO DE ANIMAIS NORMAIS E TRATADOS PELA DICOUMARINA.
Studies on dicoumarin-3,3'-methylenebis — (4-hydroxycoumarin). II. Coagulant effect of Snake Venoms (from "Bothrops" and "Crotalus") upon oxalated plasmas from normal and dicoumarin treated animals 115-132

12. **Orlando, A. e K. Silberschmidt** — ESTUDOS SÔBRE A TRANSMISSÃO DA DOENÇA DE VIRUS DE SOLANÁCEAS "NECROSE DAS NERVURAS", POR AFÍDIOS, E ALGUMAS RELAÇÕES ENTRE ESSE VIRUS E O SEU PRINCIPAL INSETO-VETOR.
Studies on the Transmission by Aphids of "Necrose das Nervuras", a Virus Disease of Solanaceae and on some relations between this virus and its principal insect-vector 133-152

13. **Pereira, C. e M. P. de Castro** — CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DA ESPÉCIE TIPO DE "MACROCHELES LATR." ("ACARINA"): "M. MUSCAEDOMESTICAE (SCOPOLI, 1772)" EMEND. — Com 22 figuras no texto.
Contribution to the Knowledge of the Type Species of "Macrocheles LATR." *("Acarina"): "M. muscaedomesticae* (SCOPOLI, 1772)" *emend.*. 153-186

14. **Pereira, C. e M. P. de Castro** — SÔBRE UM GINANDROMORFO DE "RHIPICEPHALUS SANGUINEUS LATR., 1804" — Com 2 figuras no texto.
On a Gynandromorph of "Rhipicephalus sanguineus LATR., 1804" 187-192

15. **Rodrigues, C. e V. O. Guida** — TOXINOGENESE TETANICA EM CULTURAS ASSOCIADAS.
Tetanus Toxin Production in Mixed Cultures 193-216

16. **Rodrigues, C.** — ESTUDOS SÔBRE A "MANQUEIRA". DO PREPARO E CONTROLE DA VACINA FORMOLADA — Com 2 figuras no texto.
Studies on Black-Leg. Preparation and Control of Formolized Vaccine 217-242

17. **Rodrigues, C.** — ESTUDOS SÔBRE A "MANQUEIRA". DO VALOR ANTIGENICO DE TRES TIPOS DE VACINA.
Studies on Black-Leg. On the Antigenic Value of Three Types of Vaccines 243-254

(CONTINUA)

Pags.

18. **Rodrigues, C.** — ESTUDOS SÔBRE A "MANQUEIRA". DA CONSERVABILIDADE DE VACINAS.
Studies on Black-Leg. On the Conservability of Vaccines . . 255-264

19. **Rodrigues, C.** — ESTUDOS SÔBRE A "MANQUEIRA". DETERMINAÇÃO DA POTENCIA ANTIGENICA DE VACINAS CONTRA "CLOSTRIDIUM CHAUVOEI".
Studies on Black-Leg. Determination of the Antigenic Potency of "Clostridium chauvoei" Vaccines 265-296

20. **Rodrigues, C.** — ESTUDOS SÔBRE A "MANQUEIRA". DA EFICIENCIA VACINANTE RELATIVA DE CORPOS BACTERIANOS LAVADOS E DE FILTRADOS LIVRES DE GERMENS.
Studies on Back-Leg. The relative Antigenic Potency of Washed Bacterial Cells, and of Germ-Free Culture Filtrates 297-306

21. **Meyer, J. R.** — INDÍCIOS DA EXISTÊNCIA DE UMA SUBSTÂNCIA ANTINEOPLÁSICA FORMADA NOS LÍQUIDOS DE CULTURA DO "PENICILLIUM NOTATUM".
Indication of the presence of an Antineoplastic Substance in Liquid Media in which "Penicillium notatum" was allowed to grow 307-314

22. **Planet, N. G., R. Cuocolo e W. F. de Almeida** — OBSERVAÇÕES SÔBRE PROTOZOÁRIOS INTESTINAIS HUMANOS EM UMA ZONA RURAL DE SÃO PAULO.
Human Intestinal Protozooses in a Rural Area of São Paulo, Brazil 315-336

23. **Duval, G.** — UMA NOVA ESPÉCIE DE "LISSORHOPTRUS LEC." (COL.-CURC.) — Com 6 figuras no texto e estampa 17.
A new species of "Lissorhoptrus LEC." *(Col.-Curc.)* 337-342

24. **Carneiro, V.** — CONSERVAÇÃO DO VALOR ANTIGÉNICO DAS VACINAS DE ENCEFALOMIELITE INFECCIOSA DO CAVALO.
Preservation of the Antigenic Value of Equine Encephalomyelitis Vaccines 343-352

25. **Carneiro, V.** — DURAÇÃO DA IMUNIDADE NA ENCEFALOMIELITE INFECCIOSA DO CAVALO.
Duration of Immunity in Equine Encephalomyelitis 353-360

26. **Franco do Amaral, J. e L. G. de Vasconcellos** — NOVOS ESTUDOS DO AGENTE ETIOLÓGICO DA BACTERIOSE DA MANDIOCA — Estampa 18.
Further studies of the Ethiological Agent of Bacteriosis of Cassava 361-368

———o———

Vol. 16 — Art. 1 Agosto de 1945

PESQUIZAS SÔBRE A PARALISIA DOS SUINOS

POR

P. Bueno

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 1-3

Ocorre não raramente em nossas criações de suinos, atingindo particularmente animais em período de crescimento, uma doença caracterizada por sinais de incoordenação e paralisia dos membros posteriores. Esta moléstia é vulgarmente denominada "descadeiramento".

O exame da literatura revela a existência de numerosos trabalhos de observação ou de pesquizas experimentais sôbre uma doença de características semelhantes, que ocorre também nos Estados Unidos, na Europa e na África do Sul. Esta paralisia dos suinos tem sido, entretanto, estudada particularmente pelos pesquizadores americanos, que a denominam "paralisia posterior".

Ao que nos parece, a primeira verificação da doença foi feita por WEHRBEIN (13) em 1916, que apenas relacionou os sintômas com certas alterações degenerativas das fibras nervosas do ciático. Pesquizas sôbre a sua etiologia foram porém realisadas, principalmente nestes últimos anos. CARR-FRASER (2), em 1931 relacionou-a ao fator nutrição. Em 1934, DUNLOP (4), baseado em verificações experimentais, concluiu ser a paralisia consequente à avitaminose A. Esta verificação foi confirmada em pesquizas posteriores de ELDER, (5), MOLLGAARD (11) e de KELLERMANN, SCHULZ e THOMAS (9).

Contrastando com os resultados obtidos por êsses pesquizadores, WINTROBE, MITSHELL e KOLB (14) em 1938, quando tentavam provocar em suinos condições semelhantes à anemia perniciosa do homem, pela administração de rações deficientes em determinados componentes do complexo B, observaram o aparecimento de sintômas de incoordenação, ocorrendo concomitantemente com alterações degenerativas das colunas posteriores da medula, dos nervos periféricos e das células ganglionares das vias dorsais. HUGHES (8), em trabalho publicado nesse mesmo ano, concluiu também ser a incoordenação consequente à deficiência do complexo B. Verificações feitas ainda por CHICK e seus colaboradores (3) tiveram como conclusão serem os sintômas da doença consequentes à carência de um fator desconhecido, existente no complexo B.

Em 1940, SMITH (12), fazendo considerações sôbre as doenças da nutrição nos suinos, depois de acentuar que a maior parte dos casos

de paralisia é consequente à deficiência de vitaminas, concluiu textualmente: "*The indications are that the condition involves thiamin chloride or vitamin* B_1".

De outro lado, KERNKAMP (10), fazendo também uma resenha das doenças de nutrição na espécie suina, a respeito da paralisia, emitiu o seguinte conceito: "*Clinical thiamin deficiences have been mentioned as an entity in swine. The symptoms characterizing it are note definite, but include incoordenation and paralysis. In fact the symptom complex appears to be quite similar to that in vitamin A deficiency. It is entirely possible that a critical study of vitamin A and* B_1 *deficiences in swine may show them to be concomitant etiologic factors in connection with the neurologic disorders credited to the absence of these vitamins*".

Êste breve estudo das principais referências bibliográficas demonstra indubitavelmente os resultados profundamente discordantes a que chegaram os vários pesquizadores que se ocuparam do assunto, uns concluindo ser a doença consequente à avitaminose A, outros incriminando a falta de um fator do complexo B, ou ainda um estado de carência concomitante de ambas as vitaminas.

Com base no estudo da literatura não se póde, portanto, chegar a uma conclusão segura a respeito da verdadeira causa da paralisia.

VERIFICAÇÕES PRÓPRIAS

A DOENÇA ESPONTÂNEA

Os sintômas por nós observados em um número elevado de casos de paralisia ou de incoordenação, não diferem dos assinalados por todos quantos já se ocuparam do assunto. Em geral, a sintomatologia da doença se manifesta subitamente, caracterizando-se pelos sinais de uma "paralisia posterior". Na realidade, porém, não se trata, na maior parte dos casos, de uma verdadeira paralisia e sim, mais propriamente, de uma paresia, em geral espástica; os animais podem movimentar os membros mas o fazem desordenadamente e de maneira brusca, em consequência de acentuadas contraturas ou distensões musculares. Nestes casos êles tomam frequentemente uma posição muito típica, de "cão sentado" e movimentam apenas os membros anteriores. Mais raramente os sintômas atingem êstes últimos, obrigando o animal a se manter deitado, muitas vezes em posições semelhantes às de um reptil. Outras vezes manifestam-se apenas sintômas de incoordenação, que se mostram também, particularmente, nos membros posteriores. Os animais conseguem movimentar-se, porém, com um andar incerto, desor-

denado e cáem frequentemente, levantando-se com dificuldade. Não é raro observarem-se, além do mais, manifestações de dôr, consequentes a qualquer movimento forçado.

Com o progredir das nossas pesquizas conseguimos observar também outros sintômas de tipo um pouco diverso, caracterizados por uma aproximação e muitas vezes por acentuada projeção dos membros posteriores para a frente, chegando até ao quadro de uma paralisia flácida posterior.

A sintomatologia da doença não influi grandemente, entretanto, no estado geral, pois o apetite é conservado e as outras funções, praticamente, não são alteradas. Às vezes, porém, quando os membros dianteiros são atingidos, a alimentação e a ingestão de água tornam-se difíceis, advindo daí um emagrecimento progressivo que, associado a outras causas, póde levar à morte.

Sôbre as c o n d i ç õ e s em que a doença ocorre, apenas devemos assinalar, confirmando verificações de outros pesquizadores, que a observamos tão sómente em criações que recebiam rações unilaterais e portanto, em animais mantidos em regimes de deficiência alimentar. Verificámos, frequentemente, o aparecimento da paralisia em animais de criações mantidas apenas com milho, mandioca ou farelos, sem a junção do alimento verde ou de rações proteicas.

PESQUIZAS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS

Em vista da discordancia dos resultados das investigações levadas a efeito quanto à etiologia da doença, iniciámos em 1940 estudos experimentais sôbre a paralisia dos suinos. Em nossas experimentações tentámos, no entanto, seguir um caminho de pesquizas diverso dos que já haviam sido experimentados. Ao invéz de estabelecermos regimes alimentares deficientes neste ou naquele fator, preferimos tentar reproduzir a doença nas mesmas condições sob as quais é encontrada na prática e em seguida, procurar um fator ou fatores capazes de curá-la ou de impedir o seu aparecimento.

Em vista de havermos encontrado frequentemente a doença em criações mantidas apenas com milho ou tuberculos, iniciámos nossas pesquizas administrando a um grupo de animais, rações constituidas apenas de milho e mistura mineral.

Exp. A — 10 animais (entre 3 e 5 mêses de idade) foram mantidos num período máximo, aproximadamente de 5 mêses, com ração exclusiva de milho e mistura mineral. Quatro animais demonstraram, durante êsse período, perturbações locomotoras caracterizadas particularmente por uma acentuada aproximação

dos membros posteriores e nítida projeção deles para a frente, chegando algumas vezes a alcançar os dianteiros. Três desses animais foram sacrificados e um morreu com sintômas de paralisia geral.

O exame histológico do sistema nervoso, principalmente da medula, demonstrou graves lesões nervosas, das quais nos ocuparemos posteriormente.

No decorrer dessa nossa primeira verificação, sugeriu-se-nos, naturalmente, a possibilidade de serem aqueles sintômas consequentes quer da carência de vitaminas, quer da falta de proteinas, na ração.

Exp. B — Iniciámos uma segunda experimentação administrando a um lóte de 9 animais (de 2 mêses de idade, aproximadamente) divididos em 3 grupos, rações de farinha de raspas de mandioca e mistura mineral, isoladamente ou em mistura com farinha de carne, ou ainda com fermento e óleo de fígado de bacalhau. Os animais foram mantidos nesses regimes até o período máximo de 4 mêses, aproximadamente. O primeiro grupo recebeu uma ração constituida apenas de farinha de raspas de mandioca e mistura mineral; o segundo, uma ração composta de farinha de raspas de mandioca, mistura mineral, óleo de fígado de bacalhau (10 cc por cabeça, em dias alternados) e fermento Fleischmann (15 gr por cabeça, em dias alternados); ao terceiro grupo foi administrada ração composta de farinha de raspas de mandioca 60% e farinha de carne (a 60%) 40%.

Os animais do 1.º e do 2.º grupo mostraram sintômas acentuados de incoordenação e de aproximação e projeção dos membros posteriores e sintômas de harpejamento. Às vezes deitavam-se em posições difíceis e se levantavam com dificuldade, demonstrando sentir dores. Além do mais, notou-se acentuado emagrecimento, inapetência e alterações pelagroides na pele dos animais de pelagem branca. O animal n.º 3 do 1.º grupo morreu 20 dias após o início da experiência, com sintômas de paralisia geral. Os dois restantes foram sacrificados. Do 2.º grupo morreu também o de número 3; os outros dois foram sacrificados.

Os animais do 3.º grupo não apresentaram os sintômas locomotores que descrevemos. O leitão n.º 3 resentiu-se muito com a mudança de regime, não se desenvolveu e morreu depois de quasi dois mêses do início da experimentação. O de número 1 apenas demonstrou sintomas pelagroides na pele e edema dos membros, enquanto o de número 2 se manteve, pelo menos aparentemente, normal.

O exame histológico do sistema nervoso dos animais do 1.º e 2.º grupo demonstrou graves lesões nervosas, representadas por uma verdadeira "dissolução" das células ganglionares. Os animais do 3.º grupo não apresentaram lesões desse tipo.

Esta segunda verificação experimental nos demonstrou o importante papel do alimento proteico na prevenção de certas graves lesões nervosas associadas a perturbações locomotoras, de um tipo diverso do mais frequentemente observado na prática. De outro lado, pudemos verificar nitidamente a inação das vitaminas empregadas como fatores preventivos da paralisia.

Exp. C — Dentro desta mesma ordem de idéias, tentamos uma nova verificação experimental. Tomámos um novo lóte de 12 animais, entre 3 e 5 mêses de idade, divididos em 4 grupos.

O primeiro grupo de 3 leitões passou a receber uma ração composta de farinha de raspas de mandioca 50% e farinha de carne (a 60%) 50%.

O segundo grupo de 3 animais foi alimentado com a mesma mistura, a princípio, porém posteriormente passou a receber quantidades decrescentes de farinha de carne e quantidades crescentes de farinha de raspas de mandioca, mais óleo de fígado de bacalhau (10 cc por cabeça em dias alternados, elevada posteriormente para dose diária), mais fermento Fleischmann (15 gr por cabeça em dias alternados, elevada posteriormente para 30 gr diárias), mais mistura mineral. Fizemos que êstes animais recebessem quantidades decrescentes de farinha de carne, até chegar à falta absoluta, para impedir um disturbio brusco na alimentação, ocasionado pelá supressão repentina do alimento proteico.

O terceiro grupo de 2 animais foi alimentado de maneira idêntica à do anterior, porém não recebeu óleo de fígado de bacalhau nem fermento.

O quarto grupo de 4 animais, foi alimentado com batata doce e mistura mineral.

Todo o lóte foi mantido nos vários regimes durante um prazo máximo de 4 mêses.

Em oposição à prova anterior, em dois dos animais do primeiro grupo, que receberam alimento proteico, desenvolveram-se perturbações locomotoras, manifestando-se num deles o quadro típico duma quadriplegia espástica. Num outro animal apenas observámos incoordenação.

Nos animais dos três grupos restantes, que receberam ração sem alimento proteico, desenvolveram-se os sintômas de aproximação e projeção dos membros posteriores para a frente, chegando até o quadro de uma paresia posterior flácida ou da paralisia geral.

Dois animais do 4.º grupo, depois de terem apresentado os sintômas, foram isolados e passaram a receber farinha de carne (50% do total da ração); um deles se restabeleceu completamente e o segundo melhorou consideravelmente, porém não conseguiu chegar à cura.

O exame histológico do sistema nervoso revelou, nos animais dos três últimos grupos, graves lesões semelhantes às verificadas na prova anterior. Aquelas alterações celulares não foram notadas, entretanto, nos animais submetidos ao regime rico de alimento proteico. Nesses animais observámos tão sómente a presença de uma contração celular que, em pesquizas posteriores, se demonstrou independente de qualquer estado de carencia. Nos animais submetidos ao regime de carencia proteica e que após o aparecimento dos sintômas passaram a receber farinha de carne, foram observadas, no sistema nervoso, nítidas manifestações reparativas.

Os resultados desta experimentação confirmaram em parte as observações anteriores: animais que receberam uma ração pobre de alimento proteico e contendo vitaminas A, B e D, apresentaram perturbações locomotoras com aproximação e projeção dos membros posteriores para a frente, culminando por uma paresia flácida ou pelos sintômas de paralisia geral. De outro lado, animais que receberam alimento proteico e hidrocarbonado, sem a junção de outros fatores, apresentaram sintômas de incoordenação e de paresia espástica.

Baseados nessas verificações, chegámos à conclusão de que a falta da proteina conduz ao desenvolvimento de perturbações locomotoras de um determinado tipo, relacionadas com graves lesões do sistema nervoso. Essas lesões, bem como os sintômas, regridem em seguida à administração do alimento proteico. De outro lado, animais que receberam alimento proteico em quantidades mais que suficientes, apresentaram também sintômas de incoordenação e paresia.

Pudemos assim assinalar a existência de dois quadros distintos da doença, sendo um consequente à falta de proteinas e o segundo à carência de um fator ainda não conhecido.

Com base nas verificações anteriores, que demonstraram a completa inatividade das vitaminas A, complexo B e D (a vitamina C não foi administrada, pois os suinos têm a capacidade de elaborar tal fator), como fatores preventivos dos sintômas nervosos, imaginámos ser talvez êste segundo tipo de sintômas consequente à carência de um aminoacido importante, não contido na farinha de carne. Resolvemos então administrar a caseina que, sabidamente, é considerada uma das melhores fontes de aminoacidos.

Exp. D — 3 leitões, entre 3 e 5 mêses de idade, passaram a receber uma ração composta de farinha de mandioca, 7,5 partes, farinha de carne, 1 parte, e caseina lavada, 1,5 parte.

Os animais foram mantidos neste regime por um período máximo de 4 mêses.

Em todos os animais se desenvolveram graves sintômas de incoordenação e paralisia. Um deles apresentou paralisia dos membros anteriores; à necrópsia verificamos extensa área de amolecimento da substância cinzenta, no terço superior da medula. Dois animais morreram e um foi sacrificado "in extremis".

Esta quarta prova experimental nos demonstrou não serem aqueles sintômas consequentes à possível carência específica de determinados componentes do alimento proteico.

Como última possibilidade, imaginámos ser talvez imprescindível aos animais uma ração completa, isto é, uma ração contendo proteinas, hidratos de carbono e vitaminas. Possivelmente a administração isolada dêstes ou daqueles fatores conduziria a um desiquilibrio nutritivo, originando-se daí o aparecimento dos sintômas nervosos.

Exp. E — Tomámos um lóte de 8 animais, entre 3 e 4 mêses de idade, dividido em 4 grupos. Todos passaram a receber uma ração básica (R. b.) constituida de farinha de raspas de mandioca 7,5 partes, farinha de carne (a 60%) 2 partes e caseina lavada 0,5 parte.

O primeiro grupo, mantido como testemunha, recebeu — R. b. mais capim à vontade, mais mistura mineral.

O segundo grupo — R. b. mais óleo de fígado de cação (4.000 U. I. por cc), 5 cc por cabeça e por dia, mais mistura mineral.

O terceiro grupo — R. b. mais fermento, 20 gr por cabeça, por dia, mais mistura mineral.

O quarto grupo — R. b., mais óleo de fígado de cação, 5 cc por cabeça, por dia, mais fermento, 20 gr por cabeça, por dia, mais amendoim crú, descascado, 50 gr por cabeça e por dia.

Tentámos assim obter um grupo testemunha, um grupo prova para a vitamina A, outro para o complexo B, e finalmente, o quarto que recebesse uma ração considerada completa. Os animais foram mantidos nesses regimes num prazo máximo de 5 mêses.

Os resultados desta experimentação foram contrários à toda espectativa, pois justamente os animais do quarto grupo, que estavam recebendo uma ração rica em hidratos de carbono, proteinas e vitaminas, mesmo em quantidades superiores às exigidas pelo organismo, foram os primeiros a manifestar os sintômas da doença. Quatro mêses após o início da prova um dos animais manifestou a posição típica de "cão sentado", levantando-se com muita dificuldade. A este sucedeu-se o aparecimento de perturbações locomotoras no segundo animal do mesmo grupo e nos animais mantidos com ração rica apenas em vitamina A e D. Nos animais do 1.º e do 3.º grupo não se desenvolveram os sintômas da doença.

Tais resultados nos fizeram chegar à conclusão de que os sintômas de incoordenação e paresia podem se manifestar mesmo em suinos que recebem uma ração considerada completa e particularmente rica de vitaminas.

Êsse fato nos levou então a considerar a significação do alimento verde na genese da moléstia. Na realidade, os sintômas da doença não foram observados nos animais mantidos no pasto. Uma nova experiência com 4 outros animais, mantidos com uma ração básica acrescida de capim cortado ou de couve, veio ainda mais confirmar esta suposição. Os animais se mantiveram em ótimas condições, sem demonstrar nenhum sintôma da doença.

PESQUIZAS HISTOLÓGICAS

Nossas verificações microscópicas foram feitas num total de 50 suinos, sendo 34 casos experimentais e 16 de doença espontânea. Fizemos, nesses animais, uma pesquiza histológica sistemática, de vários segmentos do sistema nervoso, como porção superior, média e inferior da medula, bulbo, ponte, tuberculos quadrigemeos, talamo, núcleo caudado, cortex (particularmente da zona motora), cerebelo, gânglios espinhais e nervos ciático e braquial.

Usamos como fixador, solução neutra de formol a 15% em água fisiológica.

Como métodos histológicos empregámos os processos de hematoxilina-eosina e tionina, como colorações de rotina, e os processos específicos de Bielchowsky, o método de Marchi e a coloração de Weigert.

Nossas observações iniciais revelaram, no sistema nervoso dos animais doentes ou submetidos aos diversos regimes de carência, a pre-

sença de dois tipos de lesão da célula nervosa: um primeiro tipo, que denominámos "contração", e um segundo, que caracterizámos como uma "dissolução" celular.

A princípio interpretámos ambas as alterações como consequentes aos estados de carência; no entanto, pesquizas posteriores nos demonstraram ser a "contração celular" uma alteração independente de qualquer estado de deficiência alimentar, pois essa alteração morfológica da célula ocorre mesmo em animais mantidos como testemunhas, recebendo rações consideradas completas.

Nos animais submetidos a um regime deficiente em alimentos proteicos, desenvolve-se com muita constância o quadro da "dissolução celular". Esta lesão ocorre particularmente entre as grandes células motoras da medula, no bulbo, na ponte, no núcleo vermelho dos tuberculos quadrigemeos e no núcleo denteado do cerebelo. Ela foi observada também nos gânglios espinhais. A lesão se inicia pela tumefação da célula e pela lise dos granulos de Nissl. O citoplasma torna-se pouco a pouco mais homogeneo e em fases mais progressas, apresenta uma estrutura finamente granulosa e muito pouco corada. Em fases ainda mais avançadas observa-se o desenvolvimento de uma acentuada rarefação do citoplasma, onde aparecem grandes espaços vasios. Preparações coradas pela tionina revelam uma nítida coloração metacromática da membrana celular, que aparece com limites bem precisos e de côr rósea. A lesão do núcleo se caracteriza, de início, por uma menor afinidade para os corantes; a fase que se segue é de lise das substâncias nucleares. Às vezes há, de início, picnóse e em seguida desintegração nuclear.

Assim, a impressão que se tem da lesão celular é de uma verdadeira "dissolução"; nas fases mais adiantadas do processo de degeneração apenas se observam resíduos nucleares e citoplasmáticos.

Os cilindro-eixos são igualmente atingidos e em geral, se apresentam fortemente tumefeitos e mal corados.

Esta lesão celular não se demonstrou em animais submetidos a um regime rico de alimentos proteicos, embora deficiente em outros fatores. Do mesmo modo os animais mantidos sem o alimento verde não apresentaram, na maioria dos casos, lesões do sistema nervoso. Apenas dois animais da experiência D, mantidos com ração rica de proteinas, porém carente de vitaminas e de alimento verde, apresentaram graves alterações nervosas: num dêles, verificou-se extensa área de amolecimento da substância cinzenta no terço superior da medula, e o segundo apresentou hemorragias sub-

meningeanas de alto grau na porção basal do encefalo. Nos outros animais, o exame microscópico do sistema nervoso nada revelou de anormal.

Por fim devemos referir os resultados das pesquizas histológicas dos nervos ciático e do plexo braquial. Neste material investigámos sistematicamente a possível ocorrência da degeneração das bainhas de mielina. Os achados foram negativos. Apenas em raríssimos casos observámos pequenos fócos de degeneração atingindo as bainhas de algumas fibras.

DISCUSSÃO

Os resultados de nossas experimentações demonstraram, de maneira evidente, que a paralisia dos suinos póde ser provocada por duas causas, que atuam isoladamente ou em associação.

A falta do alimento verde demonstrou-se causa primordial da doença. Animais que recebem uma ração completa de hidrocarbonados, proteinas e vitaminas apresentam os sintomas da doença quando não se lhes administra o alimento verde. Êste fato sugere a possível existência, na forragem, de um fator desconhecido, e provavelmente imprescindível à espécie suina. Denominámos êste elemento hipotético "fator verde".

A falta do alimento proteico evidenciou-se como uma segunda causa capaz de provocar perturbações locomotoras. Em animais submetidos a um regime pobre de proteinas, desenvolvem-se também sintômas que podem conduzir ao quadro de uma paralisia. Entretanto, a dificuldade que se encontra em avaliar exatamente o papel da carência proteica na genese dos sintômas reside no fato dela ocorrer sempre em concomitância com a falta do verde. Na realidade, os animais submetidos experimentalmente a um regime pobre de proteinas devem sofrer concomitantemente da falta do verde, pois, constituindo êste uma fonte de alimento proteico, não pode ser juntado à ração. Assim é manifesta a impossibilidade de se obter um quadro puro de carência proteica, pois a esta sempre se associa, obrigatoriamente, a falta do verde. Esta asserção está em plena concordância com o observado na prática: os sintômas da carência proteica não se desenvolvem em suinos mantidos no pasto, embora recebam êles uma ração pobre de proteinas. Admitimos, entretanto, a falta do alimento proteico, não como uma causa secundária na genese da doença, e sim, mais propriamente, como uma causa isolada, independente e capaz de provocar sintômas até certo ponto diversos e alterações histológicas

próprias, porém ocorrendo sempre em concomitância com a falta do verde.

O perfeito conhecimento do quadro puro da carência proteica só seria possível, no entanto, pelo isolamento do nosso hipotético "fator verde".

A existência de dois quadros distintos, isto é, de carência de proteinas e de falta do verde, é ainda demonstrada pela observação clínica. A falta do alimento verde conduz ao desenvolvimento de sintômas de incoordenação e de paresias, em geral espásticas; ao contrário, a carência proteica determina o aparecimento de sintômas caracterizados pela aproximação e projeção dos membros anteriores, incoordenação e paresias flácidas, chegando até o quadro de uma paralisia geral. De outro lado, a pesquiza histológica, revela a u s ê n c i a d e a l t e r a ç õ e s n o s c a s o s d e f a l t a d o a l i m e n t o v e r d e e a presença de graves lesões das células nervosas nos casos de deficiência proteica.

Parece-nos também de interesse realçar a negatividade do resultado de nossas pesquizas relativas às alterações degenerativas das bainhas de mielina. Pudemos assim verificar nitidamente a i n e x i s t ê n c i a d e q u a l q u e r r e l a ç ã o e n t r e o s s i n t ô m a s d e i n c o o r d e n a ç ã o o u p a r a l i s i a e a d e g e n e r a ç ã o m i e l i n i c a, confirmando assim os resultados de EVELETH e BIESTER (6).

Finalmente devemos considerar a razão da discordância entre os resultados das nossas investigações e os resultados obtidos por outros pesquizadores. Na verdade, as conclusões foram de sentidos os mais diversos, umas incriminando a avitaminose A como causa da doença, outras, a avitaminose B, ou ainda a carência concomitante de ambos os fatores, e finalmente a nossa, admitindo dois estados de deficiência alimentar como responsáveis pelo desenvolvimento de quadros clínicos até certo ponto diversos.

Sem dúvida alguma a circunstância que originou a diversidade dos resultados reside nos métodos de pesquiza. Enquanto aqueles autores estabeleceram métodos de investigação baseados na administração, aos animais, de dietas carentes deste ou daquele fator, nós, ao contrário, procurámos obter casos da doença, como ela se manifesta espontaneamente, tentando em seguida impedir o seu aparecimento pela correção da dieta alimentar.

O resultado de nossas pesquizas, demonstrando constituir o "fator verde" a principal causa do aparecimento dos sintômas da doença, parece demonstrar muito exatamente o motivo da discor-

dância dos resultados até agora obtidos. O fato se demonstra evidente: si a causa primordial da chamada paralisia dos suinos é a carência de um fator contido apenas no alimento verde, é óbvio que qualquer dieta carente das vitaminas A ou B ou outra qualquer, será em todos os casos carente do "fator verde". Assim, um regime idealizado para a obtenção de um estado de avitaminose A, por exemplo, será carente de vitamina A e ao mesmo tempo daquele "fator", pois o alimento verde, em vista da sua complexidade, não póde ser juntado a uma ração específica para o obtenção de qualquer estado de carência. Então os sintômas que se desenvolvem em animais submetidos a regimes deficientes em vitamina A ou em outro fator do complexo B, por exemplo, não seriam consequentes a qualquer um dêsses estados de deficiência alimentar e sim à falta do alimento verde.

CONCLUSÕES

Com base em nossas investigações experimentais sôbre a chamada "paralisia posterior" ou "descadeiramento" dos suinos, pudemos estabelecer o seguinte:

1 — os sintômas da doença se manifestam mesmo em animais submetidos a regimes completos de proteinas, hidratos de carbono e vitaminas, quando o alimento verde não é adicionado à dieta;

2 — em suinos mantidos com regimes pobres de proteina desenvolvem-se tambem sintômas, que são, entretanto, até certo ponto, diversos dos observados mais comumente na prática;

3 — estes fatos evidenciam, portanto, a existencia de duas causas capazes de provocar sintômas de "descadeiramento": a carencia de um fator desconhecido, contido no alimento verde, e a falta de proteinas. Considerando-se todavia que esta última não póde existir, independentemente da primeira, pode-se concluir que a causa essencial da denominada paralisia dos suinos é a carencia do alimento verde. Aliás, a observação prática concorda plenamente com estas verificações: a doença se manifesta sómente em criações às quais não é administrada a forragem verde.

RESEARCHES ON SWINE PARALYSIS

Abstract

Unconsistencies in several author's results as to the etiology of swine paralysis led us to do some experimental researches on this disease.

Our experiments followed a different course than that usually persued. Instead of diets in which some of the factors were deficient, we chose to reproduce the disease under the conditions usually met with and to search for one or more factors that might avoid the disease.

We experimented on 46 animals with various diets in which proteins, vitaminic factors or green food were lacking.

Our results showed clearly that swine paralysis may have two causes, which may occur either isolated or in association.

1 — When the animals were given rations in which the carbohydrates, proteins and vitamins were balanced, they showed the symptoms of the disease every time green food was not provided. This fact suggests the possible existence in the green food of some unknown factor indispensible to the swine. We named this hipothetical factor, "green factor".

2 — Symptoms — related to serious lesions of the nervous cells which we named "cellular dissolution" — are also developed in swine whose diets were deficient in proteins; the symptoms are, however, slightly different from those previously stated. They are at first characterized by a pronounced onward projection of the posterior limbs and later signs of a posterior flacid paralysis or even a general paralysis are also evident. This picture should not, however, be considered as a status of unilateral carency because it occurs as a consequence of a concomitant lack of proteic and green food; the forage, as a source of proteins, when added to the rations avoids the symptoms of proteic carency. Therefore it is obvious that to obtain the proteic deficiency status green food must not be added to the rations.

3 — Our researches, thus, evidenced the existence of two causes that may produce paralysis symptoms: 1st, lack of the unknown factor in the green food and 2nd, lack of proteins. As, however, this proteic deficiency can not prevail in the absence of the former, we come to the conclusion that the essential cause of the so-called swine paralysis is the absence of green food.

Our daily observations agree with these findings; the disease occurs only in swine which no green forage is provided.

BIBLIOGRAFIA

1 — Biester, H. E. and D. F. Eveleth — 1939 — Some Nutritional Studies in Swine. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 94: 517-521.

2 — Carr-Fraser, W. A. — 1931 — Paralysis in Pigs. *J. Sci. and Indust. Res. Australia.* 4: 255. *Ref. Vet. Bull.*, 1932, pg. 511.

3 — Chick, H., T. F. Macrae, A. J. P. Martin and C. J. Martin — 1938 — The Water-Soluble B-Vitamin other than Aneurin (Vitamin B_1), Riboflavin and Nicotinic Acid Required by the Pig. *Biochem. J.*, **32**: 2207-2224.

4 — Dunlop, G. — 1934 — Paralysis and Avitaminosis A in Swine. *J. Agric. Sci.*, **24**: 435-456. *Ref. Vet. Bull.*, 1936, pg. 886.

5 — Elder, C. — 1935 — Avitaminosis A in Swine. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **87**: 22-30.

6 — Eveleth, D. F. and H. E. Biester — 1937 — The significance of myelin sheath degeneration and its relation to incoordenation. *Am. J. of Path.*, **13**: 257-266.

7 — Hart, G. H. and H. R. Gilbert — 1937 — Symptomatology of Vitamin Deficiency in Domestic Animals. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **91**: 193-200.

8 — Hughes, E H. — 1938 — The Vitamin-B Complex as Related to Growth and Metabolism in the Pig. *Hilgardia*, **11**: 595-612.

9 — Kellermann, J. H., K. Schulz and A. D. Thomas — 1943 — Paresia in pigs in relation to nutritional deficiences. *The Onderstepoort Journal*, **18**: 225-262.

10 — Kernkamp, H. C. H. — 1941 — Diseases of Swine Due to Nutritive Deficiences. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **99**: 373-381.

11 — Mollgaard, H. — 1938 — Über Störungen im Zentralnervensystem bei der A-Avitaminose des Schweines. *Biederm. Zbl. B.*, **10**: 214-237. *Ref. Vet. Bull.*, 1941. **11**: 893.

12 — Smith, D. A. — 1940 — Clinical aspects of some nutritional disturbances in small animals. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **96**: 515-517.

13 — Wehrbein, H. — 1916 — Paralysis of pigs. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **49**: 238-244.

14 — Wintrobe, M. M., D. M. Mitshell and L. C. Kolb — 1938 — Sensory Neuron Degeneration in Vitamin Deficiency. Degeneration of the Posterior Columns of the Spinal Cord, Peripheral Nerves, and Dorsal Root Ganglion Cells in Young Pigs Fed a Diet Containing Thiamin (B_1) and Riboflavin but Otherwise Deficient in Vitamin-B Complex. *J. Exp. Med.*, **68**: 207-220.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 1

Fig. A — Paralisia espontânea. Animais submetidos a um racionamento exclusivo de milho. No animal à direita, notar a contração do membro anterior.

Fig. B — Paralisia espontânea provocada por carência do verde, associada à carência proteica.

Estampa 2

Fig. C — Deficiência proteica. Caso experimental. Notar o sinal muito típico da projeção dos membros posteriores para a frente.

Fig. D — Paralisia experimental. O animal foi mantido em regime de deficiência proteica.

Estampa 3

Fig. E — "Dissolução" celular. Notar apenas vestígio do núcleo. Desaparecimento dos granulos de Nissl. (Bulbo - carência proteica espontânea).

Fig. F — "Dissolução" celular. Hipocromasia nuclear. Tigrolise. (Medula - Carência proteica experimental).

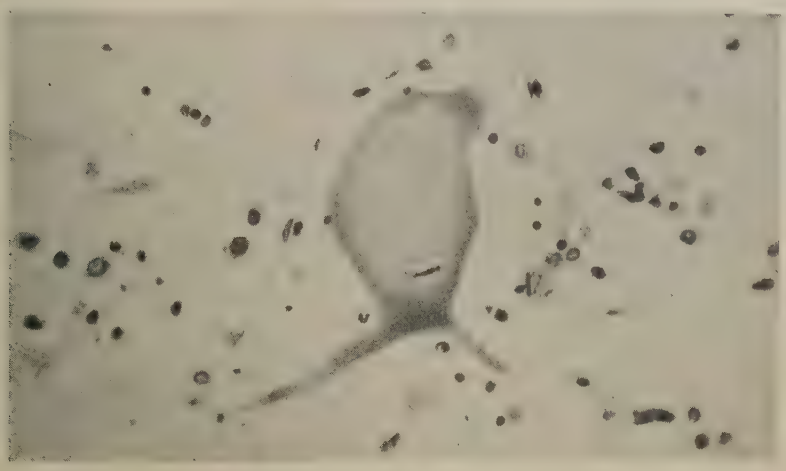
Fig. G — "Dissolução" celular. Picnóse nuclear. Rarefação do citoplasma. (Medula - Carência proteica experimental).

A

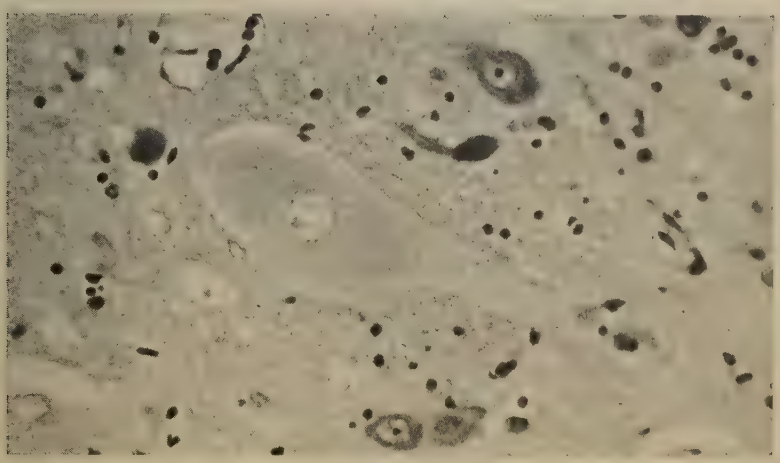
B

C

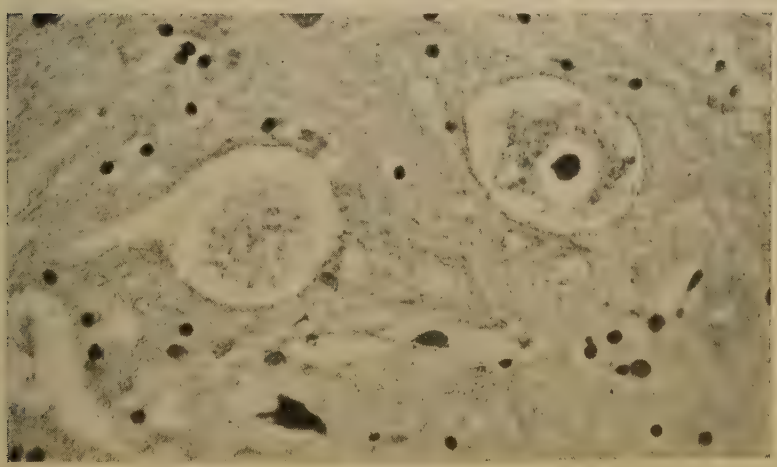
D



E



F



G

A AÇÃO DA PENICILINA NA ESPIROQUETOSE AVIÁRIA

POR

P. Nobrega e R. C. Bueno

Do Instituto Biológico de S. Paulo

A espiroquetose aviária é fàcilmente curada pelos agentes terapêuticos que atuam sôbre a sífilis humana, principalmente pelos arsenicais (9). Trabalhos recentes demonstraram que em certas condições a sífilis (7,8) é suscetível de cura pela penicilina, assim como a febre recurrente (4.6,1,3) e a doença de Weil (5,2), o que nos levou a pesquizar a ação dessa droga sôbre a espiroquetose aviária, doença muito comum no Brasil. Êste trabalho constitue uma nota preliminar, na qual se demonstra a ação indiscutível da penicilina na cura da espiroquetose; entretanto, como utilizamos doses relativamente elevadas e diversas inoculações, determinaremos em trabalho posterior a dose mínima eficaz e estudaremos a possibilidade de se obter um efeito curativo pela inoculação duma única dose de medicamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a experiência empregamos 20 franguinhos de 0,5 Kg e penicilina Squibb. Todos os animais são inoculados intramuscularmente com sangue infetado com espiroqueta, apresentando número considerável de parasitas no exame feito no terceiro dia de infecção, quando são divididos em dois grupos de dez animais: o primeiro grupo recebe 10.000 unidades de penicilina em solução fisiológica, repartidas em cinco injeções intramusculares de 2.000 unidades, dadas a partir das 7 h. da manhã, com intervalo de três horas; o segundo grupo é conservado como testemunha. No dia do tratamento o sangue dos animais é examinado após cada inoculação de penicilina; o exame é repetido nos dias subseqüentes até a morte dos animais ou desaparecimento do espiroqueta da circulação, nos testemunhas.

RESULTADOS

A tabela 1 mostra o resultado da experiência:

TABELA 1

Tratamento da espiroquetose pela penicilina
Dose: 10.000 unidades em 5 injeções de 2.000 unidades

Frangos (0,5 Kg)	Data infecção	Data tratamento	% de animais com espiroqueta no sangue				% de mortalidade
			4.10	5.10	6.10	7.10	
Tratados 10	1-10-45	4-10-45	100	10	10	10	0%
Controles 10	1-10-45	—	100	100	100	100	80%

Como se pode concluir pela análise da tabela, a penicilina, na dose indicada, cura definitivamente 9 de 10 animais tratados, determinando o desaparecimento do espiroqueta da circulação 24 horas após a administração da primeira dose do medicamento. Verifica-se outrossim sobrevida de todos os animais tratados em comparação com 80% de mortalidade entre os animais testemunhas.

CURA PELA PENICILINA E IMUNIDADE

Todos os animais tratados e reinoculados uma semana depois com sangue infetado com espiroqueta mostram-se completamente resistentes à infecção. A cura de animais atacados de espiroquetose, pela penicilina, determina assim completa imunidade a uma reinfecção posterior.

Agradecemos ao Dr. F. Caldeira Algodoal, consultor médico adjunto da E. R. Squibb & Sons do Brasil, o fornecimento da penicilina utilizada nesta experiência.

ON THE TREATMENT OF AVIAN SPIROCHAETOSIS WITH PENICILLIN

Abstract

The experiments here reported show that fowl spirochaetosis may be completely cured by the intramuscular administration of penicillin.

Nine out of ten experimentally infected fowls were found to be free from spirochaetes, 24 hours after the injection of the first dose of the drug. All of the treated birds survived, while in the control flock the average mortality was 80%.

The total amount of penicillin used for each bird was rather high, 10.000 units, administered in 5 injections of 2000 units each, with an interval of 3 hours between them.

Penicillin treated animals show complete immunity against reinfection.

The authors are now trying to ascertain the minimal curative dose of the drug an investigating on the possibility of curing infected birds with one single dose of penicillin.

BIBLIOGRAFIA

1 — Augustine, D. L., D. Weinman e J. McAllister — 1944 — Rapid and sterilizing effect of penicillin sodium in experimental relapsing fever infections and its ineffectiveness in the treatment of trypanosomiasis (Trypanosoma lewisi) and toxoplasmosis. *Science*, 99: 19-20.

2 — Augustine, D. L., D. Weinman e J. McAllister — 1944 — Penicillin sodium therapy in experimental Weil's disease. *New England, J. M.*, 231: 358-359.

3 — Eagle, H., H. J. Magnuson e A. D. Musselman — 1944 — The therapeutic efficacy of penicillin in relapsing fever infections in mice and rats. *Publ. Health Rept.*, 58: 583-588.

4 — Heilman, F. R. e W. E. Herrel — 1943 — Penicillin in the treatment of experimental relapsing fever. *Proc. Staff Meet., Mayo Clin.*, 18: 457-467.

5 — Heilman, F. R. e W. E. Herrel — 1944 — Penicillin in the treatment of experimental leptospirosis ecterohaemorrhagica (Weil's disease). *Proc. Staff Meet., Mayo Clin.*, 19: 89-99.

6 — Lourie, E. M. e H. O. J. Collier — 1943 — The therapeutic action of penicillin on Sprirochaeta recurrentis and Spirillum minus in mice. *Ann. Trop. Med.*, 37: 200-205.

7 — Mahoney, J. F., R. C. Arnold e A. Harris — 1943 — Penicillin vs Syphilis. *Science News Letter*, 44: 259.

8 — Mahoney, J. F., R. C. Arnold e A. Harris — 1943 — Penicillin treatment of early syphilis. *Am. Jour. Publ. Health*, 33: 1387-1391.

9 — Reis, J. e P. Nobrega com a colaboração de A. S. Reis — 1936 — *Tratado de Doenças das Aves*. Ed. Inst. Biológico, São Paulo, 468 pp., p. 231.

Vol. 16 — Art. 3 Novembro de 1945

NOVAS ESPÉCIES SUL-AMERICANAS DO GÊNERO ELSINOË

POR

A. A. Bitancourt

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 4-7

Dos numerosos especimens de espécies ainda não descritas de *Elsinoë* e sua forma imperfeita *Sphaceloma* colhidos desde 1936 e existentes no herbario da Secção de Fitopatologia, escolhí 4, que descrevo no presente trabalho.

A especie mais importante, já porque ataca uma planta econômica, já porque se destaca da maioria das espécies do gênero pelo tamanho dos seus ascomas, ascos e ascosporos, é sem dúvida a que ataca o castanheiro do Pará, *Bertholletia excelsa* H.B.K. De meu conhecimento, é este o primeiro fungo das fôlhas desse hospedeiro, a ser descrito. As outras espécies foram encontradas em plantas silvestres do Uruguay, Argentina, Chile e Venezuela (1).

Elsinoë bertholletiae n. sp.

Estampas 4-5

Manchas das fôlhas, numerosas, espalhadas, raramente confluentes, frequentemente mais abundantes numa das metades, esquerda ou direita, da fôlha, do que na outra, sem dúvida em consequência da prefoliação especial do hospedeiro, que determina a distribuição dos esporos antes da infecção e os agrupa, em alguns casos, ao longo de uma linha ou dobra, paralela à nervura central e a um centimetro, mais ou menos, de cada lado dela. Essa mesma dobra de prefoliação é, às vezes, séde de uma lesão mecânica onde são numerosas as manchas que coalescem em uma lesão longitudinal continua, de varios centimetros de comprimento. As manchas são visiveis nas duas faces das fôlhas, onde apresentam mais ou menos os mesmos caracteres, e são arredondadas ou, mais usualmente, irregulares, às vezes angulosas, quando delimitadas pelas nervuras terciarias. As pequenas, de menos de 1 mm de diametro, são inteiras e, tanto na face superior como na inferior da fôlha, têm a parte central de côr preta, com parte dos tecidos superficiais irregularmente levantados e, por esse motivo, de côr branca, por interposição de ar entre êles e os tecidos subjacentes, formando a periferia uma fina linha de demarcação ligeiramente saliente, de côr parda escura *(pecan brown)* (2) ou mais clara. As manchas maiores, de 1 a 4 mm de

(1) As diagnoses foram traduzidas para o latim pelo Rev. D. B. Pickel, o hospedeiro *Croton glandulosus* foi identificado pelo Dr. E. P. Killip a pedido da Dra. A. E. Jenkins, os especimens de *Myrceugenia apiculata* foram recebidos do Ing. Agr. Arentsen, por intermedio do Ing. Agr. J.M. Casanueva. A todas essas pessoas o autor consigna aqui os seus agradecimentos.

(2) As cores são indicadas aproximadamente em português. A indicação precisa em inglês é baseada em: Ridgway, R. Color standards and color nomenclature. 43 pp., 1912.

diametro, são quase todas perfuradas, com falta de parte consideravel dos tecidos do centro da mancha, e com algumas fissuras radiais que se estendem além dos limites desta. Em torno da perfuração central os tecidos se reduzem a uma membrana irregularmente dilacerada, translúcida, constituida pela justaposição das duas epidermes, em consequência do desaparecimento mais ou menos completo dos tecidos do mesofilo; mais para a periferia, os tecidos são menos alterados e portanto mais espessos, de côr branca consequente ao esvasiamento das células superficiais na parte mais central, tornando-se preta em direção à periferia, que é delimitada nitidamente por uma linha marginal saliente, usualmente de côr branca na face superior, por esvasiamento das células superficiais, de côr preta na face inferior e às vezes também na face superior. Nas duas faces os tecidos da fôlha, em torno das manchas, numa extensão de 2 a 5 mm a partir do centro, estão impregnados de um pigmento acarminado *(mineral red* a *mars violet)* superposto ao verde do parênquima foliar, formando uma mancha sem contornos definidos.

Ao longo da nervura principal há manchas alongadas, salientes, alcançando até 3 mm de comprimento, com os caracteres gerais das manchas das fôlhas.

Ascomas epifilos, visiveis na superficie das lesões como pequenos pontos pretos arredondados, intraepidérmicos, diretamente assentados sôbre o parênquima em paliçada do hospedeiro, cujas células estão na sua maioria repletas de goma amarela ou parda clara e apresentam algumas divisões por paredes periclinas, o que constitue um rudimento de periderma cicatricial. A goma também invade, em certos pontos, as células mais profundas do mesofilo, — que são, entretanto, usualmente, cheias de ar, — e alcança o lado oposto da fôlha, enchendo as células da epiderme inferior. Os ascomas acham-se bem delimitados dos tecidos do hospedeiro e estão recobertos por uma película hialina constituida pelas paredes externas das células da epiderme superior, que se acha rasgada somente em um ou outro ponto, descobrindo então os ascomas. Estes medem 70 a 180 μ de diametro por 40 a 60 μ de altura e são pulvinados, cobertos por um bem definido epitecio feito de elementos celulares irregulares e achatados, de paredes escuras, em 2 a 3 camadas que em conjunto têm 6 a 8 μ de espessura. Por baixo do epitecio, um pseudoparênquima hialino contem uma camada irregular de ascos globosos ou um tanto oblongos, medindo 25-35 x 18-30 μ, de parede interna espessa, que chega a medir 6 μ de espessura na parte superior, e contendo até 8 ascosporos hialinos, munidos de 3 a 4 septos transversais e de um septo longitudinal em uma ou mais de suas células, constritos na região do septo mediano que divide a metade superior, mais curta e grossa, da metade inferior dos esporos, os quais medem 14-22 × 6-9 μ.

A forma imperfeita *(Sphaceloma)* constitue esporodoquios intraepidérmicos, errumpentes, fortemente salientes, com os restos das paredes externas das células da epiderme superior do hospedeiro, dilacerados em torno da frutificação, abaúlados ou mais usualmente com a superficie superior plana, medindo 60 a 160 μ de diametro por 30 a 70 μ de altura, constituidos externamente por uma paliçada continua de células alongadas ou conidióforos intimamente coalescentes, medindo individualmente 12 a 20 μ de comprimento, por 3 a 4 μ de largura, às vezes munidos de um a 2 septos transversais e dilatados na parte superior que termina por uma ponta obtusa. Alguns esporodoquios estão às vezes reduzidos a uns poucos desses conidióforos, formando uma papila saliente, mas a maioria forma uma estrutura maior, que se assenta sôbre um pseudoparênquima

hialino, o qual, nos maiores esporodoquios tem paredes mais escuras e mais grossas na parte externa, donde se destacam os conidióforos, tornando-se progressivamente mais claras, até hialinas nas partes mais profundas e continuando-se por um prosênquima hialino, diretamente assentado sôbre as células em paliçada, do hospedeiro. As conidias não foram vistas.

Maculis in foliis amphigenis, numerosis, sparsis, raro confluentibus, rotundatis vel generaliter irregularibus, interdum limitatis per nervos secundarios et idcirco angulatis; minoribus vix 1 mm latis, obscuris, margine angusto, eminente, atrobrunneo; maioribus 1-4 mm latis, parte centrali albida, tum superficie destructa et radialiter fissurata, tum perfurata et margine eminente circumdata. Mesophyllo atrorubro circa maculas latitudine 5 mm a parte centrali.

Ascomatibus epiphyllis, intraepidermicalibus, bene limitatis, pulvinatis, 70-180 × 40-60 μ, epithecio obscuro, bene distincto, 6-8 μ crasso, cum parenchyma hyalino ascophoro, ascis irregulariter distributis, globosis vel oblongis, 25-35 × 18-30 μ, ascosporis usque 8-sporis, hyalinis, 3-4-septatis, uno alterove loculo longitudinaliter septato, constrictis ad septa, 14-22 × 6-9 μ.

Sporodochiis formae imperfectae (Sphaceloma) intraëpidermicalibus, erumpentibus, 60-160 × 30-70 μ, convexis vel planis, conidiophoris paliformibus, obscuris, dense coalescentibus, 12-20 × 3-4 μ, interdum 1-2-transverse septatis, prorumpentibus ex matrice folii vel generaliter ex pseudoparenchymate obscuro, sed hyalino in partibus profundis. Conidiis non visis.

Distribuição: produzindo uma antracnose das fôlhas do castanheiro do Pará *(Bertholletia excelsa* H. B. K., Lecitidiaceas) no Estado do Amazonas, Brasil.

Especimens examinados:

Culturas da Cia. Brasileira de Plantações, S. A. Estrada do Aleixo, Municipio de Manaus, Amazonas, Brasil, 11 de Agosto de 1942, A. A. BITANCOURT 947 (Tipo: IB 4436, USM 90083); Castanhal da Prefeitura, Estrada do Aleixo, Municipio de Manaus, Amazonas, Brasil, 11 de Agosto de 1942, A. A. BITANCOURT 946 (IB 4435, USM 90082).

Elsinoë chilensis n. sp.

Estampa 6

Manchas das fôlhas epifilas ou hipofilas, em ambos os casos bem definidas somente na face respectiva, onde as manchas são arredondadas, muitas vezes perfeitamente circulares, salvo nas beiras das fôlhas onde elas são semicirculares, salientes; com a parte central mais ou menos deprimida nas manchas epifilas, onde a coloração é branca, por esvasiamento das células de varias camadas dos tecidos da mancha, que são às vezes um tanto dilacerados ou desagregados; nas manchas hipofilas o centro é levemente deprimido em uma depressão raza, pelviforme, de côr parda clara *(cream buff);* nos dois tipos de manchas as margens são salientes, de coloração marron escura *(taupe brown)* formando uma linha marginal de pouco mais de 1/20 de mm de largura, impregnada de um pigmento acarminado, que desbota ligeiramente nos tecidos sãos em torno da mancha, con-

trastando com o centro branco ou pardo claro onde às vezes se distinguem pequenas saliências brancas, marron claro ou pretas, que são as frutificações do fungo causal. As manchas são esparsas ou reunidas em grupos, mais raramente confluentes e medem raramente mais de 1 mm de diametro, usualmente, 0,5 mm. Nas hastes as manchas são mais escuras e podem ser alongadas no sentido do comprimento do orgão.

Ascomas medindo 80-200 × 40-80 μ, constituidos por uma massa relativamente homogenea de pseudoparênquima, formado por elementos celulares de paredes escuras, inclusive nas partes mais profundas, sem epitecio nitidamente diferenciado, e contendo, na parte central, que é às vezes mais clara, os ascos globosos, com cerca de 20 μ de diametro, os quais contêm até 8 ascosporos hialinos, munidos de 1 a 3 septos, constritos no septo mediano, medindo 12-16 × 4-6 μ.

Pela estrutura relativamente homogenea de seus ascomas, esta espécie aproxima-se de *E. theae* e com esta constitue um grupo à parte entre as espécies do gênero.

Maculis in foliis epiphyllis vel hypophyllis, sparsis vel aggregatis, usque 0,5 mm latis, rotundatis et plerumque quasi circularibus, eminentibus, in medio depressis, albidis vel flavidis, pelviformibus, margine angusto atrobrunneo, intermixto pigmento rubro mesophyllum tingente circumcirca.

Ascomatibus 80-200 × 40-80 μ, textura pseudoparenchymatosa obscura quasi homogenea compositis, epithecio vero destituto, interne pseudoparenchymate obscuro et ascis globosis, 20 μ longis instructis, ascosporis usque 8-sporis hyalinis, 1-3-septatis, 12-16 × 4-6 μ.

Distribuição: produzindo uma antracnose das fôlhas de "arrayán" (*Myrceugenia apiculata* (D. C.) Ndz., Mirtaceas) no Chile.

Especimens examinados:

Puntiagudo (Lago Todos los Santos), provincia de Llanquihue, Chile, 30 de Janeiro de 1940, S. Arentsen St. (Tipo: IB 3557, USM 73178); Niebla, provincia de Valdivia, Chile, Maio de 1939, S. Arentsen St. (IB 3548, USM 90031) e 5 de Fevereiro de 1940, S. Arentsen St. (IB 3563, USM 73176); Pudeto, provincia de Chiloé, Chile 12 de Fevereiro de 1943, S. Arentsen St. (IB 4629, USM 90084); Laguna Larrain, Puerto Montt, Chile, 23 de Janeiro de 1940, S. Arentsen St. (IB 4876, USM 73177).

Elsinoë uruguayensis n. sp.

Estampa 7, figs. *A-E*

Manchas das fôlhas epifilas ou hipofilas, usualmente só visiveis em uma das faces, em que são muito salientes, ao passo que se distinguem na face oposta unicamente pela acentuada depressão dos tecidos, arredondadas ou irregulares, alongadas quando situadas nas nervuras ou nas margens das fôlhas, bem delimitadas dos tecidos sãos, esparsas ou às vezes coalescentes em pequenos grupos, com superficie um tanto áspera, de côr amarela clara, às vezes escurecida pela

presença de frutificações côr de fuligem, do fungo causal, medindo 0,5 a 6 mm de diametro. Nas hastes as manchas são salientes, alongadas, não raro fusiformes.

Ascomas pouco conspicuos, medindo 25 a 120 μ de diametro, constituidos por massas irregulares, mal definidas, de pseudoparênquima hialino, imerso no estroma da forma imperfeita cuja camada externa ou paliçada de conidióforos, escura, os reveste como se fôra um epitecio, e que o ascoma repele para fóra, dando-lhe uma forma pulvinada. Ascos enchendo praticamente todo o ascoma, irregularmente distribuidos em uma ou duas camadas, globosos ou obpiriformes, de parede dupla, com a interna espessa, especialmente no ápice, medindo 18 a 24 μ, contendo até 8 ascosporos hialinos, retos ou ligeiramente incurvados, munidos de 1 a 3 septos transversais, medindo 12-16 × 4-6 μ.

Forma imperfeita *(Sphaceloma)* constituindo um estroma mais ou menos continuo, revestindo a superficie da mancha, a principio intraepidérmico, depois errumpente, às vezes pouco desenvolvido, formado por uma a duas camadas, a externa escura, a interna hialina, às vezes desenvolvido num estroma mais espesso, constituido exteriormente de células irregulares, aproximadamente de 5 μ de diametro, porém geralmente mais alongadas no sentido perpendicular à superficie da lesão, e de cerca de 8 × 4 μ, de paredes relativamente espessas, com seus elementos celulares atenuados em conidióforos pouco diferenciados, e ápices convergentes em pequenos grupos cônicos. As conidias não foram vistas.

Pela formação dos ascomas no seio, ou por baixo, da forma imperfeita, sem estrutura nitidamente diferenciada, esta espécie aproxima-se de *Elsinoë australis*.

Maculis in foliis epiphyllis vel hypophyllis, postice simpliciter depressis, rotundatis vel irregularibus, bene limitatis, sparsis vel plerumque in unum coalescentibus, asperulis, flavescentibus.

Ascomatibus inconspicuis, 25-120 μ, ex massulis irregularibus compositis, vix definitis, pseudoparenchymate hyalino instructis, stromate formae imperfectae immersis, externe conidiophoris paliformibus vestito, epithecium formantibus, ascis referto. Ascis globulosis vel obpyriformibus, 18-24 μ longis. Ascosporis usque 8-sporis hyalinis, 1-3-septatis, 12-16 × 4-6 μ.

Forma imperfecta (Sphaceloma) ex stromate magis vel minus continuo, superficiem macularum occupante exstructa, plerumque pariete unius aut duorum stratuum, externe obscuro et interne hyalino, vel etiam plurimorum stratuum, externe cellulis obscuris, 8-4 μ longis, apice attenuatis instructo, conidiophoros vix differentiatos et in fasciculos conicos coalescentes formantibus. Conidiis non visis.

Distribuição: produzindo uma verrugose das fôlhas e hastes de *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Gris. (Amarantaceas) no Uruguay e na Argentina.

Especimens examinados:

Laranjal de Benito Solari, Salto, Uruguay, 28 de Abril de 1937, H. S. Fawcett & A. A. Bitancourt (Tipo: IB 2563, USM 72765); Escola Nacional de Agronomia, La Plata, Argentina, 2 de Maio de 1937, A. A. Bitancourt 638 (IB 2555, USM 90032).

Elsinoë venezuelensis n. sp.

Estampa 7, figs. *F-H*

Manchas das fôlhas, às vezes esparsas, arredondadas ou irregulares, visiveis nas duas faces, de 0,5 a 2 mm de diametro, com o centro deprimido e adelgaçado, até translúcido, e com as beiras levemente salientes, usualmente acompanhando as nervuras, inclusive as mais finas, epifilas ou hipofilas, mas visiveis na outra face, nos dois lados da nervura interessada, coalescentes em lesões lineares, irregulares, ramificadas com as nervuras, de contorno mais ou menos lobado, de 0,5 a 2 mm de largura e comprimento variavel, de côr parda clara *(cream buff, pinkish buff,* até *cinnamon buff)* e com a parte central mais clara, mas frequentemente escurecida pelas frutificações ou ascomas do fungo causal, as quais são um tanto salientes, numerosas, confluentes, de côr marron escura *(clove brown).*

Nos peciolos e nas hastes, as manchas são ovaladas, alcançando individualmente até 5 mm de comprimento, frequentemente coalescentes em lesões irregulares, extensas, ocasionalmente com pigmentação acarminada, irregular.

Ascomas superficiais, salientes, pulvinados, circulares ou ovalados, de 150 a 500 μ de diametro, por 40 a 60 μ de altura, formados por um pseudoparênquima hialino composto de pequenos elementos celulares medindo 3 a 4 μ de diametro, e cobertos por um epitecio bem diferenciado, constituido por células muito escuras, consideravelmente achatadas, em 2 ou 3 camadas, de 4 a 8 μ de espessura. Ascos numerosos, distribuidos em 2 a 3 camadas muito irregulares, globosos, com parede interna grossa, medindo 20 a 34 μ de diametro, contendo até 8 ascósporos hialinos, munidos de 3 a 4 septos transversais, constritos na altura dos septos, usualmente com septos longitudinais em uma ou mais das 3 células superiores, medindo 12-18 × 6-8 μ.

Maculis in foliis amphigenis, rotundatis vel irregularibus, 0,5-2 mm latis, in medio tenuibus, depressis, margine eminentibus vel generaliter nervos secundarios sequentibus, coalescentibus, laesiones irregulares, lineares, 0,5-2 mm latas et varie longas, obscuras vel leviter hyalinas formantibus. Maculis petiolaribus et caulinaribus elongatis, usque 5 mm longis, in laesiones magnas et irregulares coalescentibus.

Ascomatibus superficialibus, eminentibus, circularibus vel ovatis 150-500 × 40-60 μ ex pseudoparenchymate hyalino compositis, epithecio obscuro tectis, 4-8 μ crasso. Ascis numerosis, 2 vel 3-seriatis, irregulariter distributis, globosis, 20-34 μ longis, ascis usque 8-sporis hyalinis, 3-4-septatis, generaliter uno alterove loculo longitudinaliter septatis, 12-18 × 6-8 μ.

Distribuição: produzindo uma verrugose das fôlhas e hastes de *Croton glandulosus* L. (Euforbiaceas) no Estado Miranda, Venezuela.

Especimen examinado:

Los Anaucos, Cortada del Guayabo, Estado Miranda, Venezuela, 28 de Julho de 1942, A. A. Bitancourt 943 (IB 4432, USM 74802).

NEW SOUTH AMERICAN SPECIES OF ELSINOË

Abstract

Elsinoë bertholletiae n. sp. causes an anthracnosis of the Brazil nut tree, Bertholletia excelsa H.B.K., in the Amazon valley, E. chilensis n. sp. an anthracnosis of the Chilean native plant "arrayan", Myrceugenia apiculata (D.C.) Ndz., E. uruguayensis n. sp. a scab of Alternanthera philoxeroides (Mart.) Gris. a common weed in Uruguay, Argentina and other parts of the American continent and E. venezuelensis n. sp., a scab of Croton glandulosus L. in Venezuela.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 4

Elsinoë bertholletiae sôbre fôlhas de *Bertholletia excelsa*. *A*, face superior, e *B*, face inferior de uma fôlha do especimen IB 4435, Castanhal da Prefeitura, Manaus, Amazonas, Brasil, 11 de Agosto de 1942, A. A. BITANCOURT, × 1. C, face superior de uma fôlha do especimen tipo IB 4436, Cia. Brasileira de Plantações, Manaus, Amazonas, Brasil, 11 de Agosto de 1942, A. A. BITANCOURT, *a*, ascomas e acérvulos na superfície das lesões, *b*, perfurações atribuidas a insetos, × 5.

Fot. BITANCOURT e RODRIGUES

Estampa 5

Elsinoë bertholletiae sôbre fôlhas de *Bertholletia excelsa*. *D* e *E*, ascomas cobertos pelo epitecio *a*, *b*, ascosporos imaturos, *c*, ascos vasios, *d*, restos da epiderme do hospedeiro, *e*, periderma cicatricial com alguns septos transversais e em parte cheio de goma de ferida. *F*, ascos, *a*, com a parede externa rompida na parte superior e a parede interna ligeiramente dilatada para o exterior, *b*, rompidos na base e deixando escapar os ascosporos. Coloridos com azul algodão C4B. *G*, *H*, e *I*, esporodoquios da forma imperfeita *(Sphaceloma) a*, paliçada de conidióforos coalescentes, *b*, pseudoparênquima escuro, *c*, prosênquima basal hialino, *d*, parede externa da epiderme do hospedeiro, *e*, parênquima em paliçada do hospedeiro, repleto de goma de ferida. *D-F*, do especimen tipo IB 4436, *G-I*, do especimen IB 4435. Tudo × 500.

Fot. BITANCOURT

Estampa 6

Elsinoë chilensis sôbre fôlhas e galhos de *Myrceugenia apiculata*, provincia de Llanquihue, Chile, 30 de Janeiro de 1940, S. ARENTSEN ST. tipo, IB 3557. *A*, galhos e fôlhas, × 1. *B*, face superior e *C*, face inferior, de duas fôlhas, × 5. *D* e *E*, ascomas, *a*, ascos, × 500. *F*, ascosporos, *a*, e *b*, dentro do asco, *c* e *d*, livres, *e*, células inferiores de um ascosporo com um esporo secundario terminal. Coloridos com azul algodão C4B. × 500.

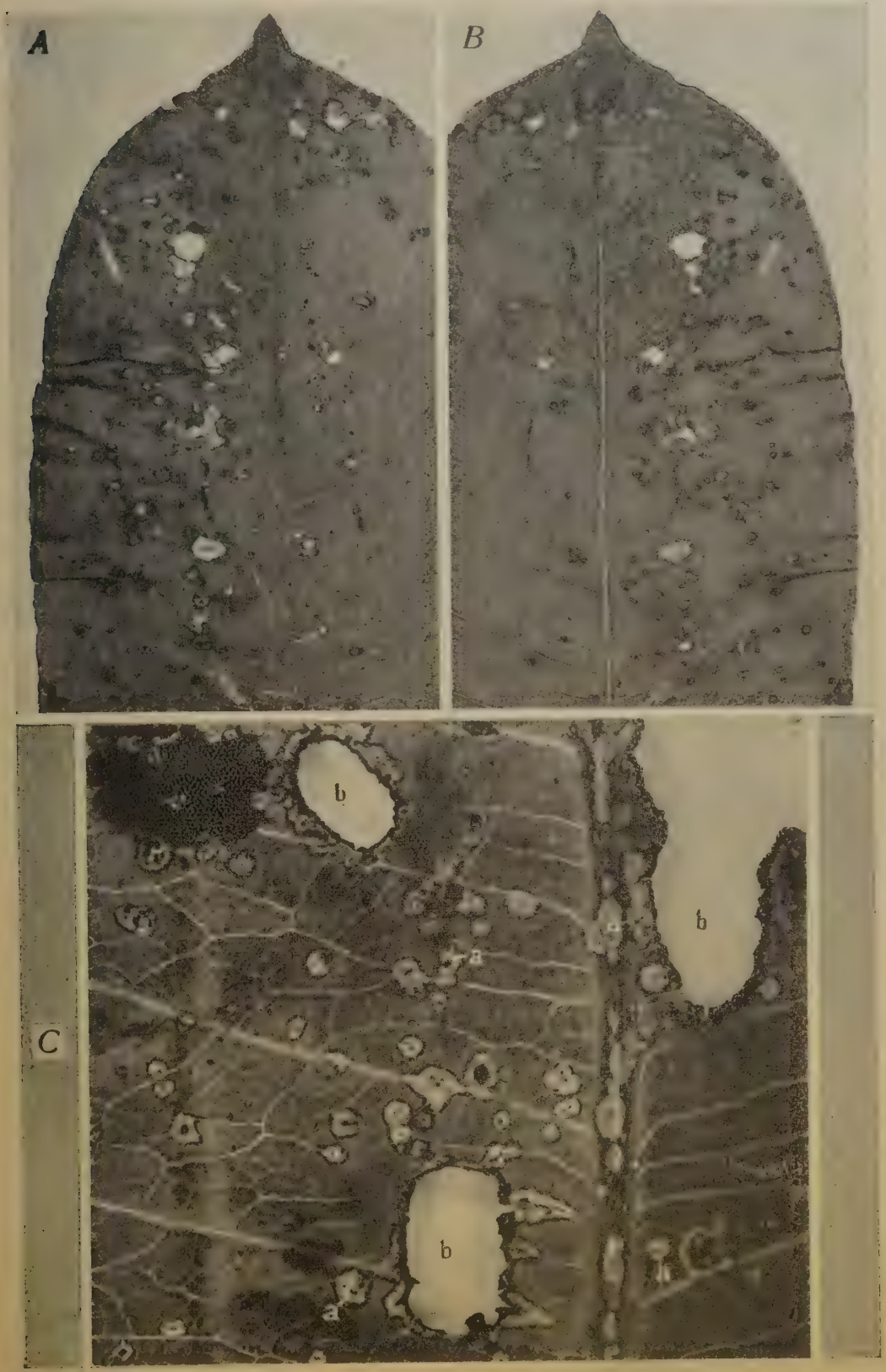
Fot. BITANCOURT e RODRIGUES

Estampa 7

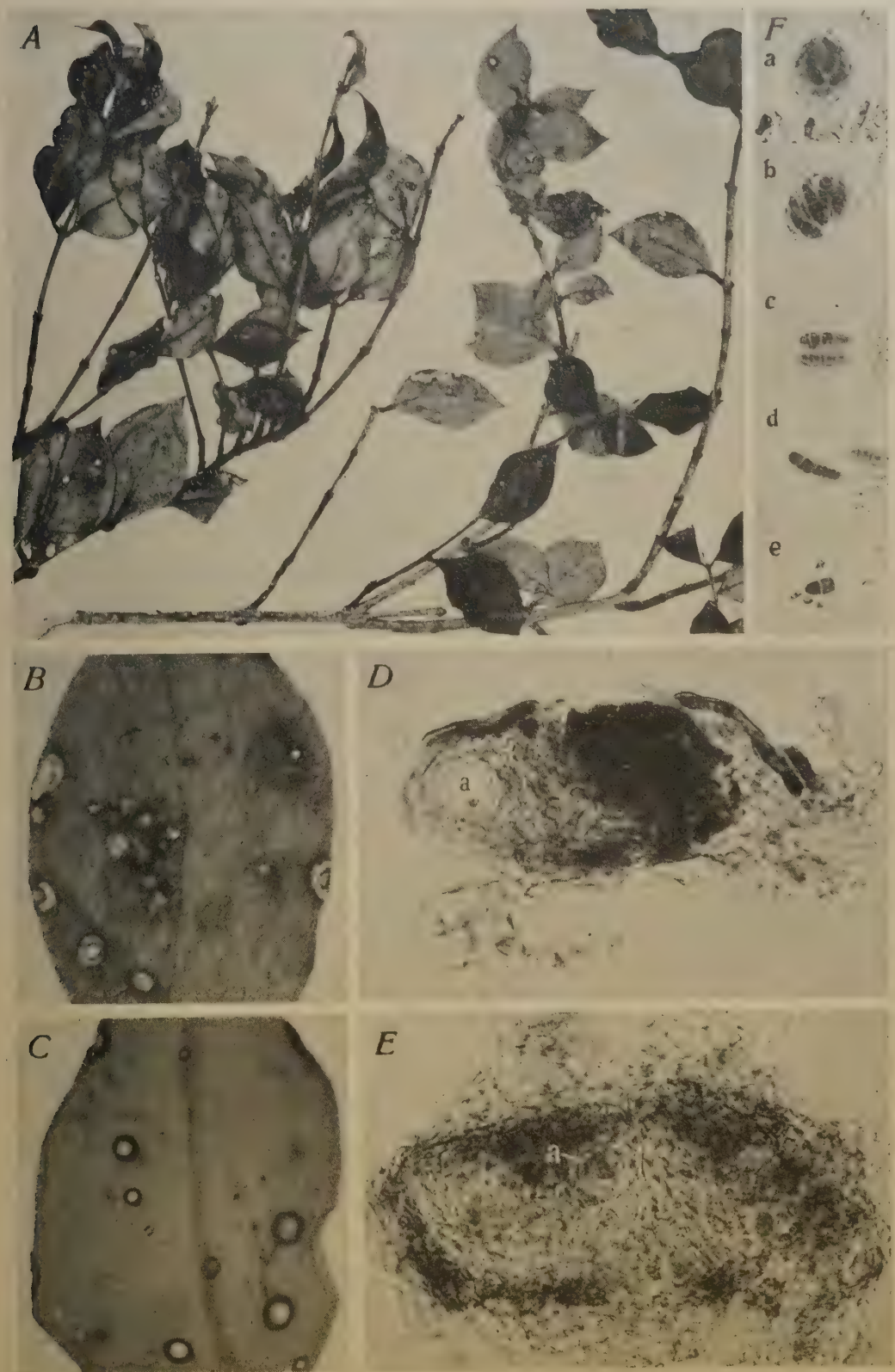
A-D, Elsinoë uruguayensis sôbre fôlhas de *Alternanthera philoxeroides*, Salto, Uruguay, 28 de abril de 1937, FAWCETT e BITANCOURT (IB 2563, tipo): *A*, face superior e *B*, face inferior, de uma fôlha, × 5. *C* e *D*, ascomas, *a*, epitecio, *b*, ascos. *E*, um asco com ascosporos, × 500.

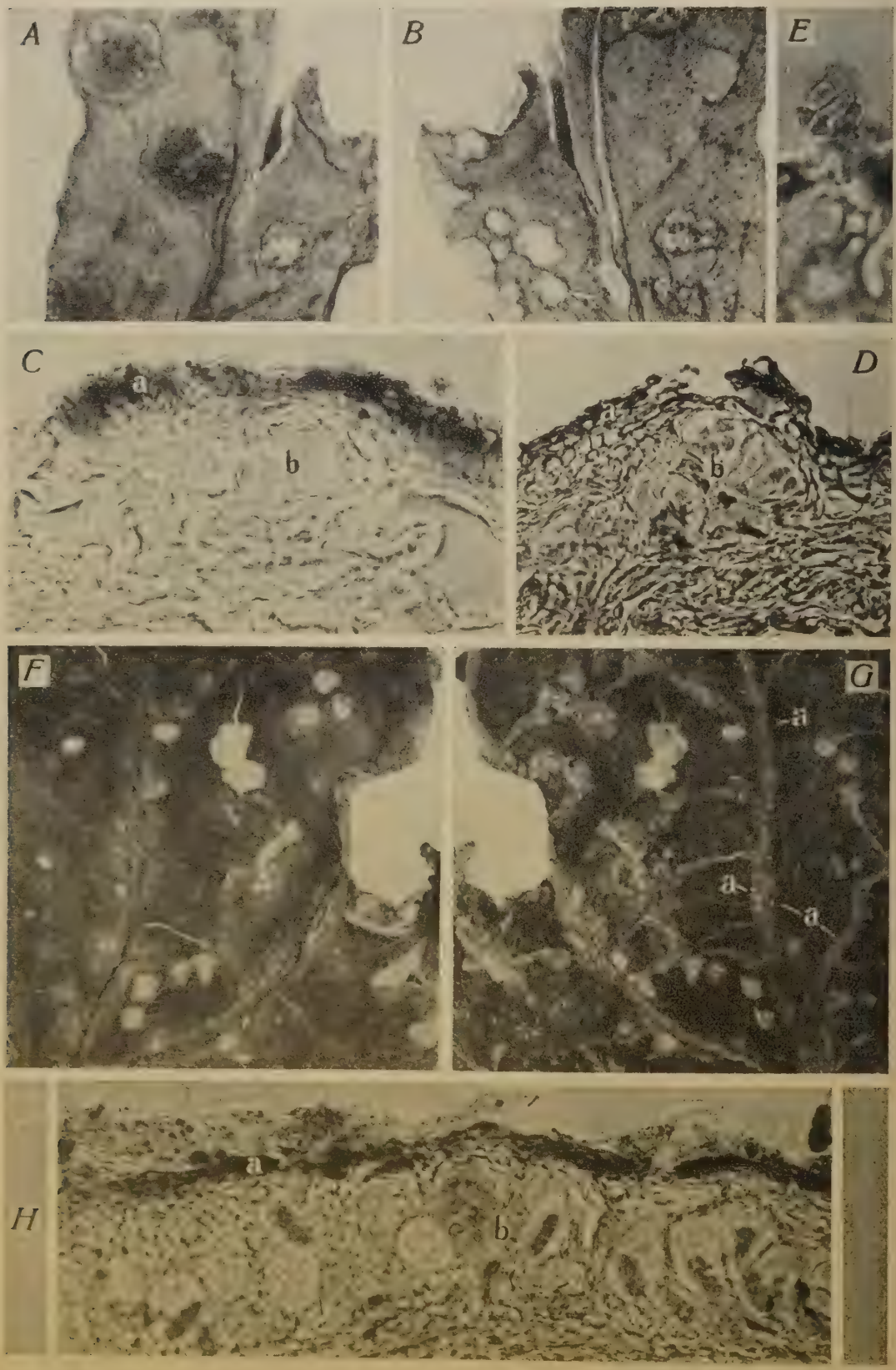
F-H, Elsinoë venezuelensis sôbre fôlhas e hastes de *Croton glandulosus*, Cortada del Guayabo, Estado Miranda, Venezuela, 28 de Julho de 1942, A. A. BITANCOURT (IB 4432, tipo). *F*, face superior e *G*, face inferior de uma fôlha, *a*, lesões ao longo das nervuras, × 5. *H*, ascoma, *a*, epitecio, *b*, ascos com ascosporos, × 500.

Fot. BITANCOURT e RODRIGUES


A
B
C
b
b
b
a
a

D
d
d
c
b
e
e
F
a
b
G
a
b
c
d
e
E
a
d
c
H
a
d
e
I
a
d
e


A
F
a
b
c
d
e
B
D
a
C
E
a


A
B
E
C
a
b
D
a
b
F
G
a
a
a
H
a
b

ESTUDOS ESTATÍSTICOS DA INFESTAÇÃO NUM CAFEZAL PELA BROCA "HYPOTHENEMUS HAMPEI (FERR., 1867)" (COL. IPIDAE)

POR

A. A. de Toledo

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 2 figuras no texto

No estudo de qualquer praga de planta de interesse econômico a avaliação da infestação torna-se indispensavel, não somente para poder-se aquilatar a extensão do ataque nos levantamentos fitossanitários, como para se formar um critério da influência de diversos fatores sôbre a praga, com especialidade o efeito de tratamentos experimentais.

Nos estudos a que estamos procedendo sôbre a broca do café *Hypothenemus hampei* (FERR.), a estimativa da infestação se tornou necessária desde o início dos trabalhos. Como não dispuséssemos de uma técnica adequada para fazer a estimativa em questão, porquanto não temos conhecimento de nenhum autor que, ocupando-se da praga, fizesse estudos sôbre esta parte, a nossa primeira preocupação foi a do possivel estabelecimento das condições em que tal avaliação fosse viavel.

O cálculo da infestação pode ser necessário na apreciação do ataque da broca a toda uma região, ou somente a um cafezal, parte deste, ou mesmo a uma árvore.

Designamos por grau de infestação a porcentagem de frutos broqueados em relação ao total de frutos de uma ou várias árvores.

O grau de infestação, assim definido, será, para um cafezal, por exemplo, a relação entre o total de frutos broqueados e o total dos frutos de todos os cafeeiros de um cafezal. Na prática, bem entendido, não é possivel essa determinação, donde a necessidade de se estabelecer aproximadamente êsse grau de infestação em quantidade muito menor de frutos, ou seja a partir de uma amostra tomada dentro da totalidade de frutos do cafezal.

E' evidente que do critério adotado para a escôlha dos frutos que devem compor a amostra, depende o valor da conclusão que se possa tirar a partir do grau de infestação da amostra, para se chegar ao grau de infestação do cafezal.

Em primeiro lugar, deve-se considerar que, num cafezal mais ou menos extenso, de árvores de todos os portes, situadas em condições topográficas diversas (espigões, ravinas e exposições variaveis), não se pode esperar infestações uniformes, ou aproximadas, mesmo muitos anos depois da instalação da praga. Em segundo lugar, no mesmo cafeeiro não se pode esperar que em todos os quadrantes e alturas, a broca esteja em número igual. As preferências do parasita por êste ou aquele quadrante podem ser devidas ao efeito direto do sol, ou outros fatores, sôbre o inseto, ou indiretamente, sôbre o fruto que êste parasita, como o grau de maturação, por exemplo. Efeitos semelhantes podem estabelecer diferenças de infestação entre as diversas alturas da árvore. Êstes fatores devem, portanto, ser levados em consideração ao se estabelecer uma técnica para a avaliação da infestação.

Com êste trabalho visámos, pois, determinar se amostras de 200 frutos tiradas em pontos diversos do cafeeiro poderiam servir para se estabelecer o grau de infestação da planta toda, e verificar se êsses diversos pontos seriam igualmente favoráveis para tal determinação

E' com prazer que manifestamos nossos agradecimentos ao Sr. Dr. J. BERGAMIN, pela cessão dos dados relativos aos dois últimos anos das observações, e ao Sr. FRANCISCO MARCIANO JR., pelo bom desempenho da parte material dos trabalhos.

MATERIAL E MÉTODO

As experiências que são o objeto do presente trabalho foram realizadas no cafezal da fazenda Santana, situada no município de Campinas, durante os meses de Junho e Julho de 1941, 42, 43 e 44.

Êsse cafezal é todo constituido por árvores de 45 anos de idade, aproximadamente, porem bem conformadas. A topografia da área ocupada pelo cafezal é, em sua maioria, constituida de ravinas e espigões bem pronunciados.

Em 1941, colheram-se amostras de 295 cafeeiros, tomados ao acaso. Em 1942, devido ao rápido andamento da colheita geral procedida pela administração da fazenda, a escassez do nosso pessoal, e exiguidade do tempo que nos restava para a coleta e exame do material, só nos foi possivel tirar amostras de 251 cafeeiros.

Em 1941 foram tiradas, de cada cafeeiro, doze amostras, aproximadamente de 200 frutos cada uma. Em 1942, por causa das dificuldades já mencionadas, seis foram as amostras tiradas de cada planta.

No primeiro ano foram tomadas três amostras em cada uma das faces do cafeeiro, expostas respectivamente aos quadrantes Norte, Sul, Leste e Oeste. A primeira na parte baixa (saia), a segunda a 1/3, e a terceira aos 2/3 da altura da árvore. Das seis amostras tomadas no segundo ano, quatro foram colhidas na parte baixa e duas aos 2/3 da altura do cafeeiro; uma na face Leste e outra na face Oeste.

As experiências do primeiro ano visaram determinar um dos setores do cafeeiro, cuja infestação désse indicação aproximada do grau de infestação de todos os frutos da árvore, e também, a relação existente entre essas duas infestações. As do segundo ano, além dêsse proposito, visaram determinar as diferenças que a êsse respeito apresentassem cafeeiros cuja situação variasse de acôrdo com a topografia e exposição da área ocupada por eles.

O total das amostras colhidas em 1942 compõe-se, portanto, de três grupos distintos: o primeiro, de amostras tiradas de cafeeiros situados numa ravina bem pronunciada e exposta ao quadrante Norte; o segundo, de amostras tiradas de árvores situadas numa ravina idêntica à precedente, porém exposta ao quadrante Sul; e o terceiro, de amostras retiradas de um grupo de cafeeiros situados na parte alta da lavoura e expostos igualmente aos quatro quadrantes.

De modo geral, os dados relativos a cada cafeeiro foram organizados de maneira que de um lado figurasse a infestação de cada amostra, e, do outro, a infestação da produção total da árvore. Estabeleceu-se assim, para cada planta, um número de pares de infestação, p a r c i a l e t o t a l, igual ao número de amostras tomado de cada uma.

Pela análise dos dados procurou-se verificar:

1.º) se a broca, desde a fase inicial do ataque, se distribue com certa uniformidade pelos diversos pontos do cafeeiro;

2.º) a correlação entre as infestações parcial e total desses diversos pontos;

3.º) se a regressão de alguma das infestações parciais sôbre a total, relativa ao segundo ano das observações, confirmava a sua correspondente verificada no ano anterior;

4.º) si a topografia da área ocupada pelos cafeeiros tem influência na correlação.

DISTRIBUIÇÃO HABITUAL DA BROCA NO CAFEEIRO

Desde o início dos trabalhos notámos que a infestação das amostras tomadas na base do cafeeiro (saia), era ordinariamente maior do que a infestação de qualquer das amostras tiradas na mesma

face da árvore, a diversas alturas, excetuando, bem entendido, os casos de uma infestação de 100%.

Esta particularidade habitual da broca, segundo verificámos, se manifesta desde o início do ataque, independentemente do tamanho e da localização do cafeeiro.

Como se depreende pelos dados da tabela I, a intensidade da infestação decresce da base para o ápice do cafeeiro, nos quatro quadrantes.

TABELA 1

Graus de infestação a três alturas de cada face de 295 cafeeiros

Quadrante	Alturas e graus de infestação em %		
	Saia	Parte mediana	Parte alta
Norte	29,9	29,8	21,5
Sul	46,6	36,6	31,8
Leste	46,5	37,3	31,5
Oeste	39,0	37,3	26,4

Procedida a análise da "variance" dos dados, com aplicação do F "test" para determinar a significância das variações (*), verificamos que, nos mesmos cafeeiros, a intensidade do ataque varia significativamente não só em função da altura, mas tambem em relação aos quadrantes do cafeeiro.

TABELA 2

Análise da variance

Variação devida a	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variance
Altura	337,94	2	168,97 **
Quadrante	241,82	3	80,60 **
Erro	36,72	6	6,12
Total . . .	616,48	11	

** Altamente significante.

CORRELAÇÃO ENTRE A INFESTAÇÃO PARCIAL E TOTAL

Quanto à correlação entre as infestações, parcial e total, as tabelas 3 e 4 resumem os coeficientes verificados em 1941 e 1942.

(*) SNEDECOR, G. W. — 1940 — Statistical Methods Applied to Experiments in Agriculture and Biology. *The Iowa St. Coll. Press.*, Ames, Iowa.

TABELA 3

Coeficientes de correlação verificados em 1941 — 295 cafeeiros

Quadrante	Parte baixa do cafeeiro (Saia)	A 1/3 da altura do cafeeiro	Aos 2/3 da altura do cafeeiro
Norte	0,82 ± 0,018	0,90 ± 0,010	0,63 ± 0,082
Sul	0,86 ± 0,015	0,80 ± 0,020	0,91 ± 0,009
Leste	0,80 ± 0,020	0,82 ± 0,018	0,90 ± 0,010
Oeste	0,84 ± 0,016	0,78 ± 0,055	0,87 ± 0,013

TABELA 4

Coeficientes de correlação verificados em 1942 — 251 cafeeiros

Quadrante	Parte baixa do cafeeiro (Saia)	A 1/3 da altura do cafeeiro	Aos 2/3 da altura do cafeeiro
Norte	0,91 ± 0,011	—	—
Sul	0,91 ± 0,011	—	—
Leste	0,89 ± 0,012	—	0,84 ± 0,036
Oeste	0,93 ± 0,009	—	0,85 ± 0,034

Quanto aos grupos de cafeeiros de localização diferente, segundo a topografia da área ocupada por eles, verificaram-se os coeficientes expressos na tabela 5.

TABELA 5

Verificação da influência da topografia do local ocupado pelos cafeeiros, na correlação, em 1942

Amostra tomada na parte baixa do cafeeiro (Saia)

Quadrante	Espigão 52 cafeeiros	Ravina face norte 96 cafeeiros	Ravina face sul 103 cafeeiros
Norte	0,76 ± 0,056	0,92 ± 0,014	0,90 ± 0,017
Sul	0,96 ± 0,010	0,93 ± 0,013	0,87 ± 0,024
Leste	0,95 ± 0,013	0,88 ± 0,022	0,80 ± 0,035
Oeste	0,86 ± 0,035	0,94 ± 0,010	0,90 ± 0,017

Consoante os coeficientes verificados, tabelas 3, 4 e 5, conclu-se que há alta correlação entre as infestações parcial e total, independentemente da parte do cafeeiro na qual se tomaram as amostras e da topografia da área ocupada pelos cafeeiros.

REGRESSÃO DA INFESTAÇÃO PARCIAL SÔBRE A TOTAL

Verificada a existência de alta correlação entre os diversos pares de infestação, vejamos agora, pelo estudo da regressão de cada infestação p a r c i a l sôbre a t o t a l, e comparação de cada equa-

ção verificada em 1942 com a sua correspondente anterior, que proveito advirá dêste estudo comparativo, quanto ao prosseguimento das observações.

Em 1942, como já referimos, não foi possivel uma repetição integral das observações feitas em 1941, quanto ao número de amostras tomadas de cada cafeeiro. Por êsse motivo o estudo da regressão de cada infestação parcial sôbre a total será apenas sôbre os seis pares de infestação cuja obtenção foi possivel em cada um dos dois anos considerados.

Formam êsses seis pares, cuja repetição foi possivel, os seguintes grupos de dados: os 4 retirados da parte baixa da árvore, a razão de um por quadrante, e os dois tirados aos 2/3 da altura do cafeeiro, respectivamente nas faces Leste e Oeste.

Efetuados os devidos cálculos, verificámos para êsses 6 grupos de dados as equações de regressão constantes das tabelas 6 e 7.

TABELA 6

Equações de regressão da infestação parcial sôbre a total, verificadas em 1941 e 1942

Quadrante	Parte baixa do cafeeiro (saia)	
	1941	1942
Norte	$Y = 6 + 1{,}073\ X$	$Y = 1{,}8 + 1{,}017\ X$
Sul	$Y = 10{,}5 + 1{,}152\ X$	$Y = 0{,}5 + 1{,}102\ X$
Leste	$Y = 11{,}3 + 1{,}134\ X$	$Y = 7{,}7 + 1{,}075\ X$
Oeste	$Y = 5{,}8 + 1{,}097\ X$	$Y = -3{,}1 + 1{,}025\ X$

TABELA 7

Equações de regressão da infestação parcial sôbre a total, verificadas em 1941 e 1942

Quadrante	Aos 2/3 da altura do cafeeiro	
	1941	1942
Norte	—	—
Sul	—	—
Leste	$Y = -2{,}8 + 0{,}804\ X$	$Y = 0{,}7 + 1{,}021\ X$
Oeste	$Y = 5{,}3 + 1{,}019\ X$	$Y = 0{,}5 + 0{,}700\ X$

Uma comparação, termo a termo, de cada equação verificada em 1942, com a sua correspondente verificada em 1941, tabela 6, mostra que a variação anual entre os coeficientes, foi relativamente

pequena, porém grande entre as constantes. Quanto às da tabela 7, houve discrepância não só entre os valores das constantes, como tambem entre os valores dos coeficientes de regressão.

Chegamos assim à conclusão de que em nenhum dos casos considerados, a regressão da infestação parcial sôbre a total, verificada em 1942, confirmou a sua correspondente verificada anteriormente, figs. 1-A e 1-B.

Isso verificado, passámos então ao estudo de grupos combinados de amostras. Analisámos inicialmente os 4 grupos de amostras tirados na saia do cafeeiro, de modo que cada um formasse, com os outros três, as combinações possiveis. Comparadas as equações resultantes, verificámos, como nos casos anteriores, grande disparidade entre elas.

À vista dos resultados negativos a que chegámos mediante as verificações procedidas, passámos então a estudar outras combinações. Desta vez combinando um dos grupos de amostras tomadas na base, com um dos dois grupos de amostras aos 2/3 da altura do cafeeiro.

Recorrendo preliminarmente ao gráfico das linhas de regressão de cada infestação parcial sôbre a total, verificadas em 1941 e 1942 (figs. 1-A e B) notamos que, ao passo que as linhas de regressão Norte saia e L 2/3 para 1941 ou para 1942 divergem sensivelmente

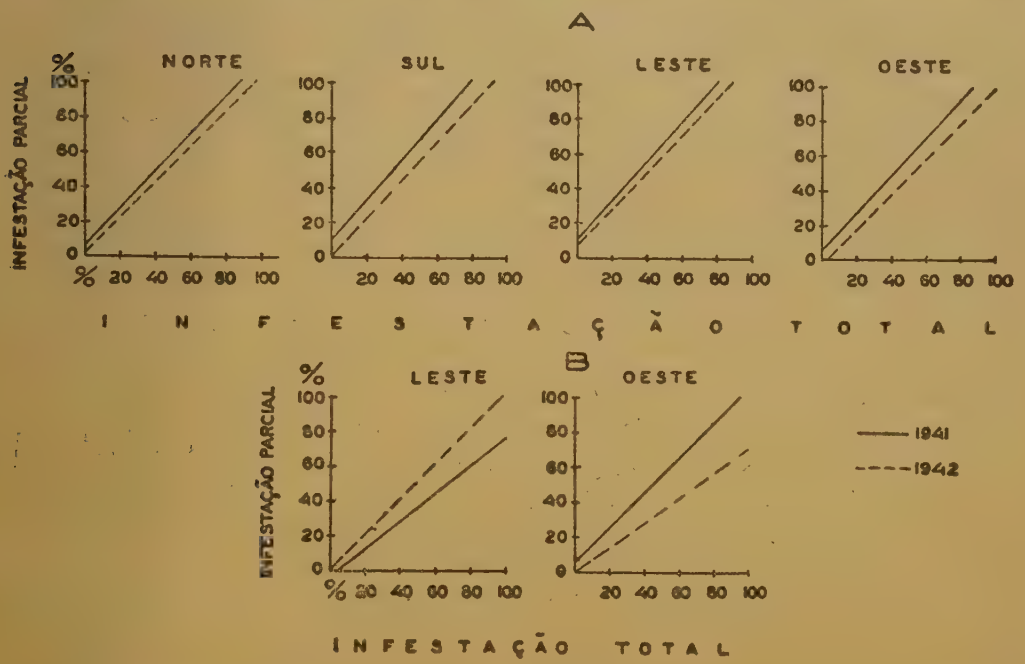


Fig. 1 — Linhas de regressão da infestação parcial sôbre a total, verificadas em 1941 e 1942 — A — parte baixa do cafeeiro (Saia) — B — aos 2/3 da altura do cafeeiro.

de ano para ano; as linhas de regressão obtidas pela análise englobada das amostras Norte saia e L 2/3 de cada ano, apresentam médias aproximadamente iguais, fig. 2-A.

Dessas análises resultaram as seguintes equações:

$$\text{Para 1941} \quad Y = 1{,}3 + 0{,}931\ X \quad (1)$$
$$\text{Para 1942} \quad Y = 0{,}9 + 0{,}980\ X \quad (2)$$

Conquanto essa grande analogia entre as duas equações dependa de confirmação experimental, ela não deixa, entretanto, de ser uma boa indicação quanto à melhor diretriz a ser dada aos futuros estudos do problema.

O número de grupos de amostras, por exemplo, pode ser reduzido para dois, Norte saia e L 2/3, como sendo os únicos cujos resultados justificam o prosseguimento das observações.

Partindo deste princípio, em 1943 as observações foram repetidas somente com os dois grupos de amostras selecionados, de cuja análise resultou a equação:

$$Y = 1{,}2 + 1{,}045\ X \quad (3)$$

Esta, como vemos, não se afasta muito das equações 1 e 2, mas o suficiente para justificar a quarta e última verificação.

As observações foram assim encerradas em 1944 com o seguinte resultado:

$$Y = 2{,}8 + 1{,}090\ X \quad (4)$$

Comparando-se, finalmente, as equações 1, 2, 3 e 4, verifica-se uma ligeira discrepância entre elas e, portanto, entre as respectivas linhas de regressão.

Tratando-se, porem, de um problema de ordem biológica, como é o do presente caso, por conseguinte influenciado anualmente por vários fatores, era natural que tais variações ocorressem.

Contudo, baseado na razoavel concordância existente entre as 4 equações, podemos concluir que, entre a infestação parcial Y e a total X, há uma relação cuja constância comporta o seu emprego em verificações de carater prático. Para isso é indispensavel, porem, que uma única relação, média das quatro anuais, seja estabelecida.

Com este propósito os dados obtidos nos quatro anos de estudo foram reunidos em um só grupo, de cuja análise resultou a equação média final:

$$Y = 1{,}8 + 0{,}991\ X \quad (5)$$

com um erro de estimação de $\pm$ 11,6% do valor de Y.

INFLUÊNCIA DE ALGUNS FATORES NA RELAÇÃO VERIFICADA ENTRE OS VALORES DE X E DE Y

Embora alcançado o objetivo do presente trabalho, isto é, o do estabelecimento de um processo pelo qual fosse possivel a estimativa do grau de infestação pela broca, dos frutos pendentes de um grupo de cafeeiros, resta saber, porem, se a relação verificada entre X e Y (equação 5 ou fig. 2-B) prevalece independentemente da topografia e exposição da área do cafezal, assim como do número de amostras consideradas.

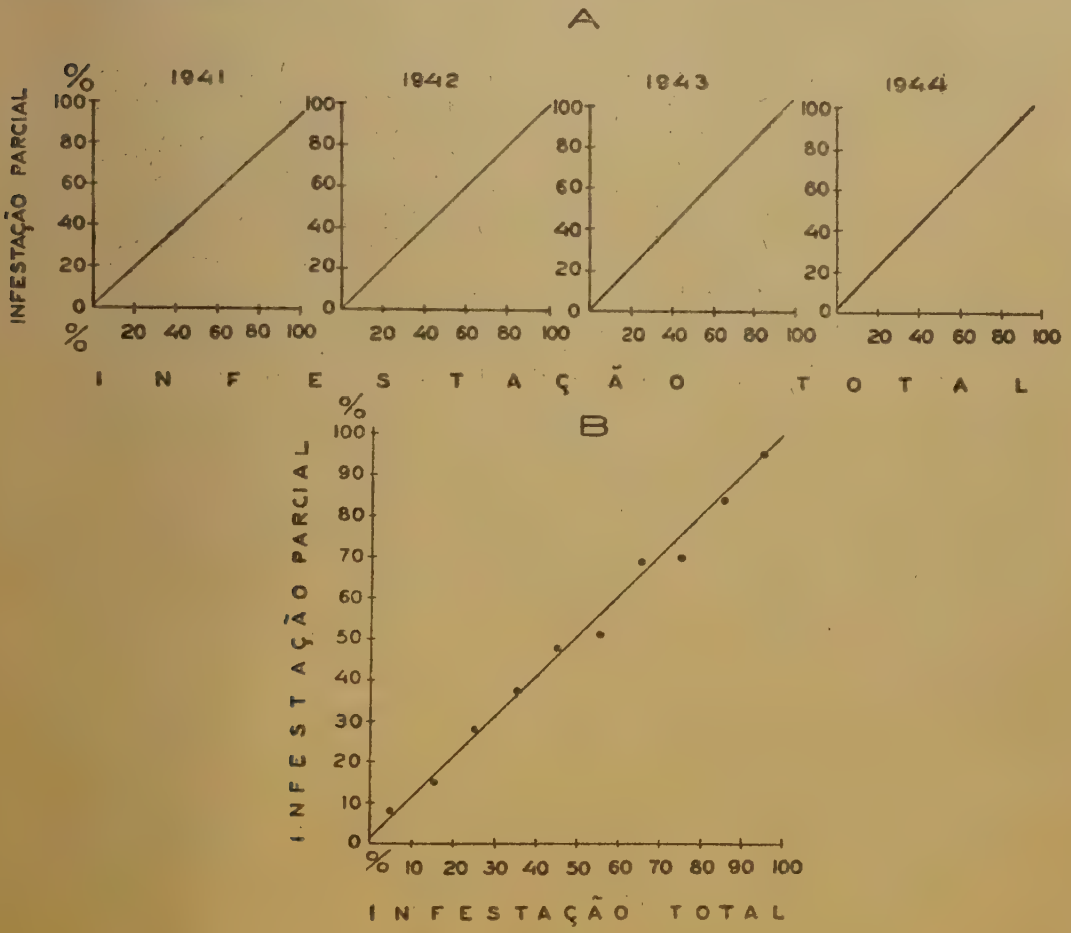


Fig. 2 — A — Linhas de regressão da infestação parcial, Norte saia — Leste 2/3, sôbre a total, verificada em 1941-42-43 e 44. B — Linha de regressão representativa da média das quatro anuais.

Como já foi referido, os dados relativos ao ano de 1942 foram obtidos de três grupos distintos de cafeeiros, dois dos quais situados em ravinas de exposição diferente, e um no assento de um espigão.

Comparando-se os graus de infestação verificados experimentalmente nesses grupos de cafeeiros (tabela 8) com os que se verifica-

riam mediante o emprego da relação estabelecida entre as variaveis X e Y (equação 5), vejamos qual possa ser a influência dêsses fatores.

TABELA 8

Influência da topografia e exposição da área do cafezal na relação estabelecida entre X e Y

	X verificado %	Y verificado %	Y calculado %	Desvio %
Ravina face Norte	28,4	31,4	29,9	— 5,0
Ravina face Sul	49,0	50,0	50,3	+ 0,5
Espigão	20,4	21,3	22,0	+ 3,1

A comparação, em cada caso, do valor verificado de Y com o seu correspondente calculado, mostra que o desvio em qualquer dos casos fica entre 0,5 e — 5,0%.

Quanto a esta parte, de modo geral, pode-se concluir que a relação estabelecida entre X e Y, prevalece independentemente da topografia e da exposição da área ocupada pelo cafezal.

Passando ao estudo da influência do número de amostras, vejamos a que limite é possivel restringi-lo sem prejuizo da relação considerada.

Para esta verificação, de cada grupo de dados obtidos nos quatro anos de estudo, tomaram-se por sorteio algumas parcelas de 25, 50 e 100 amostras, de infestação conhecida.

De posse dêsses elementos, a verificação foi procedida comparando-se o valor de cada Y verificado com o seu correspondente calculado, tabelas 9, 10 e 11.

TABELA 9

Comparação dos valores de Y, verificados e calculados sôbre 25 amostras

X verificado %	Y verificado %	Y calculado %	Desvio %
18,1	15,8	19,6	+ 19,3
27,8	28,3	29,3	+ 3,4
22,2	23,2	23,7	+ 2,2
22,1	19,0	23,6	+ 19,4
18,6	18,9	20,2	+ 6,4
13,1	17,1	14,7	— 16,3

TABELA 10

Comparação dos valores de Y, verificados e calculados sôbre 50 amostras

X verificado %	Y verificado %	Y calculado %	Desvio %
24,0	24,0	25,5	+ 5,9
20,6	20,7	22,0	+ 5,9
17,3	19,2	18,9	— 1,5
15,7	18,9	17,3	— 9,2
22,8	22,0	24,3	+ 5,3
29,9	25,7	26,4	+ 2,6
22,1	21,1	23,6	+ 8,8
20,3	18,9	21,8	+ 13,2

TABELA 11

Comparação entre os valores de Y, verificados e calculados, sôbre 100 amostras

X verificado %	Y verificado %	Y calculado %	Desvio %
25,6	28,7	27,1	— 5,9
19,0	20,1	19,6	— 2,5
23,2	23,2	24,7	+ 6,0
30,0	31,7	31,5	— 0,6

Os desvios assinalados nas tabelas 9, 10 e 11 indicam claramente que a relação estabelecida entre as variaveis X e Y, é dependente do número de amostras, e outrossim, que ela prevalece a partir de 50 amostras para mais, pois a amplitude do desvio se reduz à medida que o número de dados é aumentado para o limite máximo considerado, de 100 amostras.

Quanto a esta parte pode-se concluir que, embora 50 amostras sejam suficientes para uma verificação de carater prático, jogando-se com 100 amostras haverá, evidentemente, maior probabilidade de chegar a resultados mais seguros.

CONSIDERAÇÕES COMPLEMENTARES

Consoante as verificações realizadas, conhecida a infestação parcial Y, a total X pode ser facilmente deduzida.

Mas a determinação do valor de Y requer uma soma de trabalho cuja simplificação será de grande alcance prático.

Como facilmente se depreende, a tomada das amostras, ainda mesmo que seja de uma grande quantidade, constitue a fase mais simples de toda a operação, enquanto a verificação do grau de ataque, pela broca, em cada uma delas, requer uma soma de trabalho incomparavelmente maior.

O trabalho requerido por esta fase das verificações mais se salienta se considerarmos que 100 é o número de amostras necessariamente indicado para uma verificação prática. Sendo cada amostra constituida por 400 frutos, dos quais 200 tirados na saia e 200 na parte alta do cafeeiro, as 100 amostras contem, portanto, 40.000 frutos a serem examinados.

Além de morosa, se as amostras forem estudadas separadamente, esta parte do serviço não deixa de ser tambem antieconômica.

Considerando-se porém, que na realidade o que interessa conhecer é a infestação média do total e não a de cada amostra em separado, a questão se simplifica.

Basta, para tanto, uma vez colhidas as amostras, misturá-las o melhor possivel e determinar, pelo exame de uma parte da mistura, o grau médio de infestação do total.

Acontece, porem, que não há indicação pela qual seja possivel avaliar a homogeneidade da mistura. Contudo, para se ter maior certeza de que a parte retirada é tanto quanto possivel representativa da infestação média do todo, procede-se da seguinte maneira: espalha-se a mistura e retira-se uma porção em cada um de dez pontos diferentes.

Assim procedendo, ter-se-á uma amostra cuja infestação é a representativa do grau médio da infestação da mistura e, por conseguinte, das 100 amostras.

No ato da tomada das amostras, para maior rapidez do serviço, pode-se tambem substituir a contagem dos frutos que deve conter cada amostra, pelo volume da amostra , 200 cc de café tomados em cada um dos pontos mais indicados: Norte saia e L 2/3, do cafeeiro, constituem uma boa amostra.

CONCLUSÕES

Em última análise, podemos tirar dêste trabalho as seguintes conclusões: a) que a broca, excetuando-se os casos de 100% de infestação, não se distribue uniformemente no cafeeiro; b) que, independentemente da situação e exposição do cafezal, há sempre alta correlação entre a infestação parcial e total; c) que a regressão da infestação parcial sôbre a total, para grupos idênticos de amostras, é variavel de ano para ano; d) que a regressão da infestação parcial (média da infestação da saia, face Norte e Leste, 2/3 da altura do cafeeiro) sôbre a total, é aproximadamente uma constante; e) que a topografia e exposição da área ocupada pelo cafezal não altera a relação estabelecida entre as variaveis X e Y; f) que em aplicação

de carater prático, para que a relação estabelecida entre X e Y prevaleça, é indispensavel que pelo menos 50 amostras sejam tomadas; g) que a coleta e verificação do grau de ataque das amostras, pela broca, são susceptiveis de simplificação.

STATISTICAL STUDIES OF THE INFESTATION OF A COFFEE PLANTATION BY THE COFFEE BERRY BORER — *"HYPOTHENEMUS HAMPEI* (FERR., 1867)" (COL. IPIDAE)

Abstract

This paper deals with a number of experiments, the result of which led the author to suggest the possibility of using samples of infestation, to estimate the percentage of infested fruits, in a coffee grove, by the coffee berry-borer H. hampei (Ferr.).

Samples were taken at the rate of three per quadrant N.S.E. and West, from three different heights, namely: lowest, middle and 2/3 height of each tree.

High correlation was found to prevail between samples and crop infestations at harvest time during the following seasons: 1941-42-43 and 44.

As to the regression equations worked out, only one was consistent from the first to the last season of the observations. Even this was furnished by two groups of samples, taken as a whole. From these two groups, one was taken from the lowest branches exposed to the north side and the other, from the 2/3 of the coffee tree height, exposed to the East side.

$Y = 1.8 + 0.991\ X$ was the mean regression equation worked out for the four years of observations.

Vol. 16 — Art. 5 Novembro de 1945

VIRAGEM DA COLORAÇÃO POR UMA LACA FÉRREA DA HEMATEINA PELA PRATA AMONIACAL, PARA O ESTUDO DAS LEISHMANIAS, PRINCIPALMENTE NOS TECIDOS

POR

C. Pereira e H. Medina

Do Instituto Biologico de S. Paulo e do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnologicas de Curitiba

Com a estampa 8

INTRODUÇÃO

Nos nossos trabalhos em andamento, sôbre leishmaniose, chegamos à conclusão de que é possivel evidenciar a presença dos parasitos nos tecidos e nos esfregaços, pelos mais variados processos de coloração. Entretanto, revelou-se precária a obtenção de imagens com o máximo de contraste, capazes de proporcionar microfotografias de grande precisão quanto ao realce dos pormenores estruturais do protozoário, e assim reduzir ao mínimo o coeficiente pessoal na interpretação dos fatos observados.

Experimentando as diferentes técnicas de se obterem lacas férreas da hemateina ou seus derivados, pois se haviam revelado promissoras de melhores resultados, tivemos que escolher entre os chamados "métodos azues", de execução rápida, com menor intensidade de oxidação do componente orgânico da laca, e os "métodos pretos", clássicos, muito lentos.

As lacas clássicas teem a seu favor a grande nitidez de contraste, a que deve a fama; entretanto, a lentidão inerente à própria feitura, possibilitando fenômenos de maceração, constitue um óbice ao seu uso indiscriminado.

Pelos "métodos azues", rápidos, podem-se obter colorações intensas e bem diferenciadas; entretanto seu contraste não é suficiente, do ponto de vista microfotográfico.

A comparação dos métodos simultâneos e sucessivos de obtenção das lacas azues levou-nos a preferir a segunda modalidade, que possibilita em pouco tempo as colorações mais enérgicas, susceptíveis de sofrer uma diferenciação bem intensa, pois os métodos simultâneos são relativamente lentos e mais adequados às colorações progressivas, justamente as menos indicadas para o nosso caso.

Dada a semelhança de comportamento entre os diferentes compostos férricos utilizaveis para obter-se tal laca, como o sulfato férrico, utilizado por BENDA (1885 *apud* GATENBY e COWDRY, 1928), o alume ferri-amoniacal por HEIDENHAIN (1892, *apud* LEE e MAYER, 1898), o acetato férrico por BUETSCHLI (1892, *apud* LEE e MAYER, 1898), o tartarato férrico por FRANCOTTE (1898) ou o cloreto férrico por MALLORY (1900), demos preferência ao cloreto, cujas características de solubilidade nos reativos usuais (água, álcool, glicerina) são as mais satisfatórias, não oferecendo sua manipulação maiores dificuldades. Devido à higroscopicidade do sal, embora partíssemos inicialmente do produto anhidro, terminamos por fazer dele uma solução estoque, de densidade 1,32 (U.S.P. XII), cujo teor em sal é da ordem de 50 por cento, contendo 10-11% de Fe^{+++}, e cuja estabilidade é assegurada pela alta concentração, quando guardada em frasco escuro, ao abrigo das poeiras. Usamos como mordente uma diluição dessa solução estoque, a 10% em água distilada, segundo MALLORY (1900).

Quanto à hemateina, preferimos mantê-la sob a forma de solução estoque a 10%, em partes iguais de álcool a 95-96% e de glicerina; de fato, na solução simplesmente alcoólica, como foi aconselhado de início por BOEHMER (1865, *apud* LEE e MAYER, 1898) e, principalmente, a partir de WEIGERT (1884), embora o fenômeno se passe com muita lentidão, vai havendo sempre uma oxidação progressiva, que termina por deteriorar o corante; a adição de glicerina, preconizada por MAYER (1896, *apud* LEE e MAYER, 1898), exerce função estabilizadora notavel, alem de melhorar as qualidades solventes do álcool.

Trabalhando-se com hematoxilina, é aconselhavel, em caso de urgência, oxidá-la pelo processo de SHORTT (1923), que dá resultados imediatos e muito seguros: dissolver 1 g de hematoxilina em 95 cm^3 de água distilada em ebulição, juntar 5 cm^3 de ácido fênico fundido, deixar esfriar, ficando então pronta para o uso. Não havendo urgência, pode-se proceder como foi indicado no parágrafo anterior, dispensando porém a adição de glicerina, justamente para permitir a oxidação parcial até hemateina.

Inicialmente, partindo da solução estoque, diluíamos a hemateina a 1% em água distilada, segundo MALLORY (1900); entretanto a solução devia ser usada apenas quando recente, pois alterava-se logo no dia seguinte; por esse motivo passamos a diluí-la a 1% em mistura de água distilada (30%) e de álcool a 95-96% (60%), de modo a trabalharmos nas condições aproximadas das de WEIGERT (1903,

apud GATENBY e COWDRY, 1928). Preparada deste modo, a solução de hemateina pode ser usada durante alguns dias, o que permite apreciavel economia do reativo.

Quanto à reação da solução de hemateina, parece-nos problema relativamente secundário no que diz respeito ao resultado final da coloração; assim, trabalhando com a solução tamponada junto da neutralidade, segundo FREITAS (1936), acidulada, segundo KULTSCHITZKY (1890, *apud* LEE e MAYER, 1898) ou alcalinizada, segundo WEIGERT (1884), esta posteriormente aplicada, parece que pela primeira vez, ao estudo dos flagelados, por SALVIN-MOORE e BREINL (1907), verificamos que todas essas soluções podiam corar satisfatoriamente. Entretanto as soluções alcalinizadas revelaram-se mais expeditas do que as outras, e ainda com a apreciavel vantagem de se prenderem muito mais rápida e energicamente sobre o aparelho cinético, o que, aliás, seria de esperar, tendo-se em mente a atividade diferenciadora das soluções ácidas, não somente nas lacas dos derivados da hematoxilina, como nos corantes básicos em geral, o que as torna indicadas para o estudo do núcleo.

Para maior comodidade, em lugar da solução saturada de carbonato de lítio, que havia sido empregada inicialmente pelos autores, preferimos usar o amoníaco (D = 0,925, teôr = 20%), do qual preparamos uma solução aquosa a 1%; ao fazermos a solução diluida de hemateina, em lugar dos 30% de água distilada usamos a mesma proporção de água amoniacal a 1%.

Procurando reunir o máximo das condições para a obtenção da coloração mais enérgica no menor tempo, fomos levados a experimentar ainda a cooperação de outras substâncias dotadas de atividade mordente geral. Conseguimos assim apressar o processo de produção e fixação da laca, o que parece não ter significação especial para a coloração da cromatina, mas revelou-se muito util no estudo das estruturas citoplásmicas; esse comportamento deve ser mera consequência da adsorção difusa do complexo tano-férrico, como foi utilizado inicialmente por ALLERHAND (1897, *apud* GATENBY e COWDRY, 1928) para a coloração da mielina, com resultados semelhantes aos obtidos até então com as lacas de hemateina por WEIGERT e outros. Mais recentemente SALAZAR (1920) explorou as aplicações citológicas do complexo tano-férico, empregando-o posteriormente como mordente para derivados da hematoxilina, no processo a que ele mesmo (1941, *apud* SALAZAR, 1944) denominou combinação posttânica.

Empregamos o tanino sob a forma de solução aquosa a 20%, conforme ALLERHAND (1897, *apud* GATENBY e COWDRY, 1928), à qual juntamos 1% de fenol para impedir os germes de contaminação.

Portanto a nossa solução de hemateina ficou, finalmente, assim constituida: 10 cm³ da solução glícero-alcoólica de hemateina a 10%; 60 cm³ de álcool a 95-96%; 20 cm³ da solução aquosa de amoníaco a 1%; 10 cm³ da solução aquosa de tanino a 20%.

Outro problema tambem por nós investigado foi o relativo à diferenciação da laca. O estudo comparativo dos diversos diferenciadores, à luz da discussão do assunto por BENDA (1901, *apud* GATENBY e COWDRY, 1928), levou-nos a dar preferência ao ácido pícrico, não em solução aquosa, como foi preconizada por BENDA (1898, *apud* GATENBY e COWDRY, 1928) sob a forma da chamada mistura de VAN GIESON, ou por GUARNIERI (1906, *apud* GATENBY e COWDRY, 1928), com solução aquosa saturada, em virtude da intensa dissociação que sofre, equiparando-o às soluções ácidas, que agem muito grosseiramente, e sim sob a forma de solução saturada no álcool a 95-96%, como foi usado inicialmente por PODWYSSOZKI (1886, *apud* LEE e MAYER, 1898) para a diferenciação da safranina, o que permite reduzir o nivel da sua dissociação, de modo a fazer predominar na operação os fenômenos de substituição.

Quando nos pareceu haver sido atingido o máximo de intensidade, rapidez e precisão na coloração e, considerando que a laca azul de hemateina é susceptivel de se oxidar, dando uma série de derivados gradativamente menos hidrogenados, e como o óxido de prata, nas mãos de TRIBONDEAU, FICHET e DUBREUIL (1916) houvesse revelado eficácia no condicionamento da oxidação da hematoxilina, imaginamos que a laca azul, fixada eletivamente sobre o material, pudesse agir como redutor em face de um complexo de prata amoniacal, de maneira a tornar possivel um processo de "viragem" pela prata após a coloração pela laca hemateínica, nos moldes da pelo ouro em seguida às impregnações pela prata, e com a mesma ordem de delicadeza nos resultados.

A experiência deu resultados concordes com a hipótese, pois usando diversos complexos de prata amoniacal conseguimos a redução do metal em preto ao nivel das estruturas previamente coradas pela laca hemateínica, que assim parece ter-se comportado simultaneamente como mordente e redutor do complexo de prata amoniacal, com a grande vantagem de podermos determinar o grau de impregnação metálica, através da diferenciação adequada da laca hemateínica, controlavel ao microscópio.

Demos preferência ao complexo de prata amoniacal de HOYER (1876, *apud* LEE e MAYER, 1898), não só por ser o mais simples de preparar, como por motivo de prioridade, o que procuramos tambem atender, na medida do possivel, na citação dos outros reativos usados. A técnica da sua preparação é a seguinte: a 10 cm³ de uma solução de nitrato de prata a 10% em água distilada, pinga-se amoníaco, gota a gota, sob agitação constante, até que o precipitado inicial seja praticamente todo redissolvido, com cautela para não juntar reativo em excesso; depois, acrescentar água distilada até completar o volume de cerca de 200 cm³, de modo a conseguir-se um teôr, expresso na quantidade original do nitrato de prata, da ordem de 0,5%, quando fica pronto para ser usado.

Quando a impregnação metálica atinge o ponto desejado, a lâmina é lavada rapidamente com água, tratada pela solução de hipossulfito de sódio afim de impedir redução ulterior, lavada profusamente com água, e montada em bálsamo de acôrdo com as técnicas usuais.

Reativos:

1. Diluição aquosa a 10% da solução oficinal de cloreto férrico.
2. Solução saturada de ácido pícrico em álcool a 95-96%.
3. Solução aquosa de hipo-sulfito de sódio a 2%.
4. Solução de hemateina:

hemateina, solução a 10% em partes iguais de álcool a 95-96% e de glicerina	10 cm³
álcool a 95-96%	60 cm³
amoníaco, solução aquosa a 1%	20 cm³
tanino, solução aquosa a 20%	10 cm³

5. Complexo de prata amoniacal: precipitar e redissolver pelo amoníaco uma solução de nitrato de prata a 10%, e diluí-la a cerca de 0,5% do teor em nitrato.

Método:

Para a obtenção da laca férrea da hemateina, adotamos em linhas gerais o esquema de MALLORY (1900), sôbre lâmina, tanto para os cortes como para os esfregaços, por nos parecer o mais simples e perfeitamente seguro.

1. Mordançar na solução de cloreto férrico, 1 minuto no mínimo.
2. Sem lavar, corar pela hemateina, 3 minutos no mínimo.

Observação: não se preocupar com o precipitado; pingar gota a gota o corante sôbre o material, de modo que o precipitado seja repelido para o rebordo da lâmina. Para a obtenção de colorações muito intensas será preferivel repetir esses dois primeiros tempos, uma ou mais vezes, de acôrdo com a exigência do material, a prolongar a duração das manipulações. Obtem-se uma coloração azul-negro intensa, extensiva tambem ao citoplasma.

3. Passar água e diferenciar pelo ácido pícrico, 0,5 minuto ou mais.

Observação: o material torna-se esverdeado.

4. Passar água e virar pelo complexo de prata amoniacal, 5 minutos ou mais.

Observação: recoberto o material pela prata amoniacal, esta começa por extraír-lhe o excesso de ácido pícrico, devolvendo-lhe imediatamente a côr azul inicial; em seguida a coloração azul vai escurecendo cada vez mais, até atingir um tom francamente acinzentado, que coincide com a coloração preta da cromatina. Não permitir que a operação vá além deste ponto, pois o material começará a adquirir tonalidade esverdeada, indicativa de que a prata já estará sendo reduzida difusamente e com granulação mais grosseira, que se traduzirá por coloração acastanhada ao exame com objetiva de imersão, e pelo depósito desordenado e excessivo do metal por todo o material, sem maior eletividade.

5. Passar água e tratar pelo hipossulfito, 1 minuto ou mais.

6. Lavar com água, deshidratar, diafanizar e montar em bálsamo.

Resultados: cromatina, nucléolos, centríolos, aparelho cinético dos flagelados e estrias transversais musculares, em preto; citoplasma acinzentado; hemácias azuladas. As *Leishmania* são facilmente reconheciveis com grande aumento a sêco e claramente definidas com imersão.

Observação: embora não vejamos vantagem particular nisso, este método permite as colorações de contraste com os corantes ácidos usuais. Os fixadores mais indicados são os de base no ácido pícrico, no sublimado corrosivo ou no bi-cromato de potássio.

TONING IN THE AMMONIACAL SILVER OF THE STAINING BY AN IRON HEMATEIN LAKE, FOR THE STUDY OF LEISHMANIAE, SPECIALLY IN THE TISSUES

Abstract

After the trying of many techniques for the study of Leishmania in the tissues, the following is proposed.

Staining solutions.

1. Ferric chloride, U.S.P., XII solution, aqueous dilution to 10 per cent.

2. Pícric ácid, saturated solution in 75-76 per cent ethyl alcohol.

3. Sodium thiosulfate, aqueous solution, 2 per cent.

4. Hematein solution: hematein, 10 per cent in alcohol-glycerin mixture — 10 ml; 95-96 per cent alcohol — 60 ml; 1 per cent ammoniacal solution — 20 ml; tannin, 20 per cent aqueous solution — 10 ml.

5. Ammoniacal silver: to a 10 per cent aqueous solution of silver nitrate, add ammonia drop by drop, shaking well until the

precipitate is just dissolved; dilute the solution to 0,5 per cent silver nitrate.

Method of staining.

1. Mordant sections in the ferric chloride, 1 minute or longer.

2. Stain in the hematein, on the slide, 3 minutes or longer.

3. Rinse in water, and differentiate in the alcoholic picric acid, 0,5 minute or longer.

4. Rinse in water, ande tone on the slide in the ammoniacal silver solution, 5 minutes or longer.

5. Rinse in water, and fix in the sodium thiosulfate solution, 1 minute or longer.

6. Wash in water, dehydrate, clear and mount in balsam.

R e s u l t s . — Chromatin, nucleoli, centrioles, cinetic apparatus of the flagellates and certain parts of striated muscle fibers are stained black; cytoplasm grayish; red blood cells blueish. The L e i s h m a n i a are easily visible at the high dry power and sharply defined with the oil immersion lens.

BIBLIOGRAFIA

FRANCOTTE, P. — 1898 — Recherches sur la maturation, la fécondation et la segmentation chez les Polyclades. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, 3.e série, 6: 189-298.

FREITAS, G. DE — 1936 — Um método de coloração citológica pela hemateina férrea. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 31: (3) 707-712.

GATENBY, J. B. e E. V. COWDRY — 1928 — *Bolles Lee's Microtomist's Vade-Mecum*, 9th edition. J. & A. Churchill, London, X + 714 + 24.

HARRIS, H. F. — 1900 — On the rapid conversion of haematoxylin into haematein in staining reactions. *Journal of Applied Microscopy*, 3: 777-780.

LEE, A. B. e P. MAYER — 1898 — *Grundzuege der mikroskopischen Technik fuer Zoologen und Anatomen*, R. Friedlaender & Sohn, Berlin, IX + 470.

MALLORY, F. B. — 1900 — A contribution to staining methods. *Journal Experimental Medicine*, 5: 15-20.

SALAZAR, A. L. — 1920 — Méthode de coloration tanno-ferrique. *Comptes Rendues des Scéances de la Societé de Biologie*, 83: 1655-1657.

SALAZAR, A. L. — 1944 — La technique du tannin-fer. *Stain Techonology*, 19: (4), 131-135.

SALVIN-MOORE, J. E. e A. BREINL — 1907 — Appendix II. Modification of Heidenhain Haematoxylin method, used during the foregoing investigations, pág. 471, *in* The citology of the trypanosomes, part I. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 1: (3), 441-480.

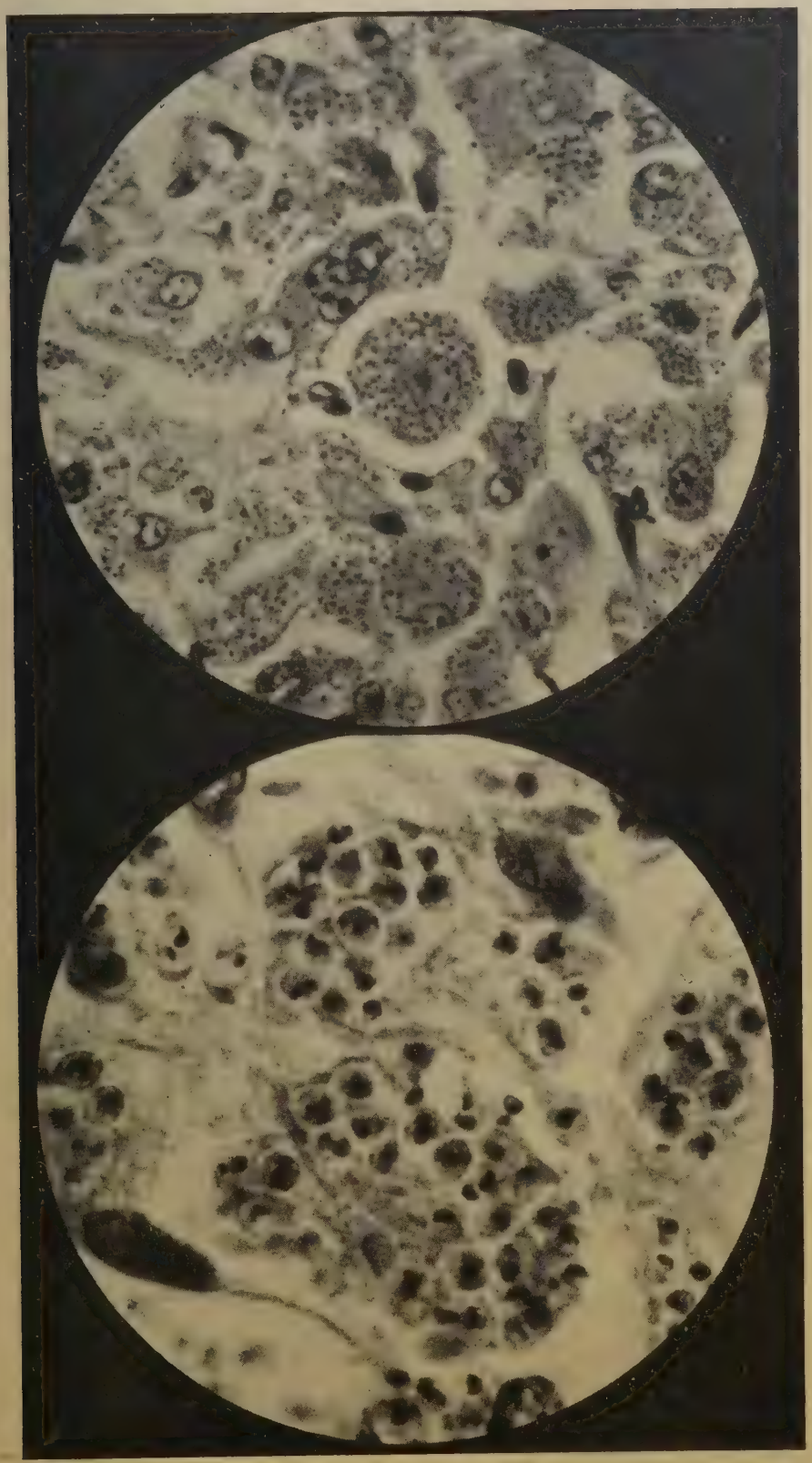
SHORTT, H. E. — 1923 — Note an the iron haematoxylin staining. *Indian Journal Medical Research*, 10: 836.

TRIBONDEAU, L., M. FICHET e J. DUBREUIL — 1916 — Nouvelle technique de coloration des coupes par l'hémalun-éosine. *Comptes Rendues de la Societé de Biologie,* 79: 288-289.

WEIGERT, C. — 1884 — Ausfuerliche Beschreibung der in No. 2 dieser Zeitschrift erwaehnten neuen Faerbungsmethode fuer das Centralnervensystem. *Fortschritte der Medizin,* 2: 190-191.

EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA 8

Fig. *A* — Macrófagos com leishmanias, grande aumento a sêco.
Fig. *B* — Macrófagos com leishmanias, imersão.



A

B

Vol. 16 — Art. 6 Novembro de 1945

OBSERVAÇÕES SUPLEMENTARES SÔBRE A TRANSMISSÃO EXPERIMENTAL DA "CLOROSE INFECCIOSA" DAS MALVÁCEAS

POR

K. Silberschmidt

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 9-12

Entre as espécies cuja suscetibilidade à "clorose infecciosa" das Malváceas foi estudada por nós num trabalho anterior (12, 1943) incluimos também uma ali denominada *Sida cordifolia.*

Após a publicação fomos, porem, cientificados pelo distinto botânico e especialista do gênero *Sida,* Prof. MONTEIRO FILHO, da Escola Nacional de Agronomia do Rio de Janeiro, de que a fôlha representada na estampa 12 C do referido trabalho e aí designada com o nome de *"Sida cordifolia"*, não exibia as características dessa espécie.

Ficou provado, depois, pelo exame, que o Prof. MONTEIRO gentilmente executou em material de herbário, por nós remetido, que de fato nos tinhamos enganado ao incluir esse material na espécie *Sida cordifolia,* pois ele pertencia, sem dúvida, à espécie *Sida Glaziovii* K. SCHUM. Retificando esse erro, queremos deixar frizado que ele correu inteiramente por nossa conta e também, ao mesmo tempo, manifestar-nos sinceramente gratos ao Prof. MONTEIRO pela sua justa observação, que veiu demonstrar o seu interesse pelo nosso trabalho.

Em consequência desse nosso intercâmbio com o Prof. MONTEIRO FILHO sentimo-nos estimulados a estudar tambem a suscetibilidade da verdadeira espécie *Sida cordifolia* à "clorose infecciosa". Veiu aumentar o nosso interesse nestas observações o fato de termos verificado que o comportamento dessa espécie ante o virus em questão é bem diferente do das espécies já estudadas (por exemplo *Sida rhombifolia, Sida Glaziovii*) e que material daquela espécie, disponivel para os ensáios, podia ser encontrado no próprio terreno do Instituto Biológico.

Incluimos nestas experiências em que visavamos esclarecer a suscetibilidade de várias espécies de Malváceas à "clorose infecciosa", alem de *Sida cordifolia,* tambem plantas de *Sida purpurascens* e de *Abutilon crispum.* Estas duas últimas espécies são frequentes no

Nordeste e devemos as suas sementes à grande gentileza do Snr. MANUEL ALVES DE OLIVEIRA, agronômo da Inspetoria das Sêcas, em São Gonçalo (Paraíba). Em todos os ensáios efetuados com estas espécies, empregamos a enxertia como método de transmissão experimental da "clorose infecciosa".

Ao comunicar, no presente trabalho, os resultados desses ensáios, queremos ainda acrescentar algumas observações complementares, referentes à possibilidade da transmissão da "clorose infecciosa" pelas sementes e por parasitas fanerógamas.

I) Resultados de ensáios de transmissão experimental da "clorose infecciosa" por meio de enxertias, realizadas com a espécie *Sida cordifolia* L.

Os resultados das nossas experiências executadas com a espécie *Sida cordifolia* L., de transmissão experimental da "clorose infecciosa" por meio de enxertia, estão reunidos, em ordem cronológica, na tabela I.

Na interpretação dessa tabela vamos, em primeiro lugar, dar uma idéia da maneira pela qual se manifesta a "clorose infecciosa" das Malváceas nos representantes da espécie *Sida cordifolia*. Em seguida nos referiremos ao período de incubação, ou seja, o tempo que o virus causador da "clorose infecciosa" leva para passar do componente doente para o sadio da enxertia, e para provocar neste último os primeiros sintomas de doença.

a) Encontramos, em fins de 1943, numa área coberta de vegetação espontânea do terreno do Instituto Biológico, alguns pés de *Sida cordifolia*, que na sua maioria não exibiam sintomas de "clorose infecciosa". Uma das plantas, porem, de tamanho um pouco mais reduzido, apresentava fôlhas de superfície enrugada, com pequeno número de manchas verde-amareladas de contorno irregular. O tipo dos sintomas é ilustrado pelas fôlhas mosaicadas dos cavalos das nossas figuras *A* e *B* da estampa 9.

Nas plantas experimentalmente infeccionadas encontramos ainda outros sintomas como, por exemplo, anéis cloróticos mal definidos e situados no limbo, entre as nervuras secundárias, ou um esclarecimento das nervuras, restrito geralmente a uma parte do limbo.

Para poder discernir, com segurança, exemplares infeccionados pela "clorose infecciosa", das plantas sadias, consideramos apenas as manchas angulares amarelas como indícios da doença, somente levando as outras anomalias em consideração, quando elas se manifestavam em fôlhas novas e eram acompanhadas pelas referidas manchas amarelas.

TABELA 1

Ensáios de transmissão, por enxertia, da "clorose infecciosa" para plantas sadias de *Sida cordifolia*

N.º de experiência	Data da experiência	Combinação da enxertia	Método	N.º de enxêrtos pegados		N.º de enxêrtos não pegados	Período de incubação em dias	Período médio de incubação em dias
				com transmissão da doença	sem transmissão da doença			
1-a)	10/ 4/1944	*Sida rhombifolia* d. sôbre *Sida cordifolia* s. . .	garfo	2			40, 129	85
1-b)	10/ 4/1944	*Sida acuta carp.* d. sôbre *Sida cordifolia* s. . .	garfo	2			119, 129	124
1-c)	10/ 4/1944	*Sida cordifolia* d. sôbre *Sida cordifolia* s. . .	garfo	1			86	
2-a)	11/12/1944	*Sida cordifolia* d. (s. sint.) sôbre *S. cord.* s. . .	garfo	2	2	4	65, 65	65
2-b)	11/12/1944	*Sida acuta* d. (com sint.) sôbre *S. cordifolia* s. .	garfo		1	2		
2-c)	11/12/1944	*Sida cordifolia* s. sôbre *Sida cordifolia* d. (s. sint.)	garfo		1			
3-a)	23/ 1/1945	*Sida rhombifolia* d. sôbre *Sida cordifolia* s. . .	garfo	1	1	6	32	
3-b)	23/ 1/1945	*Sida acuta* d. sôbre *Sida cordifolia* s.	garfo	4	1		31, 32, 48, 150	65,2
3-c)	23/ 1/1945	*Abutilon spurium* d. sôbre *Sida cordifolia* s. . .	garfo	1?	5		32	

Já desta descrição dos sintomas pode-se inferir que as manifestações da "clorose infecciosa" em representantes da espécie *Sida cordifolia* são em geral consideravelmente mais brandas do que nas outras espécies de *Sida* por nós estudadas e em *Abutilon striatum.*

Ao passo que nestas outras espécies não há dificuldade nenhuma em identificar-se uma planta doente, já a distinção entre plantas sadias e infeccionadas na espécie *Sida cordifolia* torna-se às vezes bastante dificil. Isso provem não só da brandura, como ainda da ocorrência localizada e passageira dos sintomas, nesta espécie.

A esse respeito existe grande diferença entre o comportamento de *Sida cordifolia* e o de outras espécies, como por exemplo de *Sida rhombifolia.* Se numa planta desta última espécie o virus chegou a invadir, seja no caule ou num ramo lateral, o ponto de vegetação, este continua durante muito tempo formando fôlhas nitidamente atacadas pela doença. Em plantas de *Sida cordifolia* experimentalmente infeccionadas, porem, os sintomas mostram-se apenas esporadicamente em uma ou duas fôlhas e depois os pontos de vegetação passam outra vez a produzir fôlhas não distinguíveis das de plantas sadias. (Veja fot. estampa 9, *A* e *B.*)

Dessa maneira, só poucas fôlhas, talvez justamente as que no momento de infeção se achem numa determinada fase do desenvolvimento, chegam a exibir, de fato, sintomas da "clorose infecciosa", ao passo que as outras possuem ou adquirem uma maior tolerância contra o agente causador da doença. Esse comportamento da espécie *Sida cordifolia* ante o virus da "clorose infecciosa" lembra muito a reação, estudada principalmente por PRICE (10, 11; 1932, 1940), de *Nicotiana tabacum* ao virus do "*ringspot*" do fumo. Cerca de 8 dias após a inoculação de exemplares de fumo com o referido virus, observa-se, nas fôlhas novas das plantas, o aparecimento de grande número de anéis concêntricos necróticos, que chegam a cobrir a totalidade do limbo dessas fôlhas. Com o decorrer do tempo. porem, nas fôlhas sucessivamente formadas, os sintomas restringem-se a áreas cada vez menores do limbo, até que aparecem novamente fôlhas inteiramente isentas de sintomas, embora possuindo resistência a uma reinoculação com o virus do "*ringspot*". PRICE considera essa reação do fumo ao virus do *ringspot* como exemplo típico de uma "imunidade adquirida". WALLACE (13, 1939), estudando o restabelecimento *(recovery)* de diversas plantas hospedeiras, depois de atacadas pelo virus da doença "*curly top*", prefere substituir o termo "imunidade adquirida" pelo conceito de "tolerância adquirida". Queremos crêr, pois, que tambem as nossas plantas de *Sida cordifolia* demonstraram uma espé-

cie de "tolerância adquirida" ante o virus da "clorose infecciosa", a qual porem não coincide inteiramente com o tipo descrito por PRICE. Enquanto nas plantas de fumo, atacadas pelo virus do *ringspot*, podemos observar entre as fôlhas inteiramente marcadas por sintomas e as fôlhas isentas, uma série de fases intermediárias de infecção, em plantas de *Sida cordifolia* inoculadas com o virus da "clorose infecciosa" verificamos apenas a ocorrência de sintomas fracos em algumas fôlhas, e a falta completa deles nas restantes.

Desejamos fazer pelo menos uma tentativa para esclarecer as causas fisiológicas dessa tolerância. Com esse fim resolvemos verificar se plantas de *Sida cordifolia* experimentalmente infeccionadas com a "clorose infecciosa" e já não exibindo mais sintomas da doença, podiam ainda transmitir o agente causador a plantas originalmente sadias. Referem-se a esse problema os ensáios 2a e 2c da nossa tabela 1. O grupo de enxertias, que reunimos na série 2a, compunha-se de cavalos sadios de *Sida cordifolia* e de enxêrtos da mesma espécie, tirados dos exemplares experimentalmente infeccionados nos nossos ensáios anteriores (10-4-44-), mas que já não exibiam mais sintomas da doença.

E' verdade que dois dos cavalos sadios enxertados (25% do total) chegaram a apresentar, dois mêses mais tarde, sintomas de "clorose infecciosa". Os sintomas, neste caso, eram porem extremamente brandos, testemunhando assim um poder infeccioso do virus, bastante reduzido. Esta nossa suposição foi também confirmada pelo resultado do ensáio n.º 2c, que consistiu em enxertar sôbre um porta-enxerto doente de *Sida cordifolia*, mas não exibindo sintomas, um enxêrto sadio de *Sida rhombifolia*. O enxêrto pegou, sem exibir sequer os mais ligeiros sintomas de "clorose infecciosa".

Acreditamos não haver necessidade de nos extender aqui quanto às prováveis causas do baixo poder infectivo do virus da "clorose infecciosa" exercido por garfos de *Sida cordifolia*, uma vez que, em trabalho anterior (12, 1943, 149-152), já tratamos detalhadamente de problema semelhante. Basta dizer que a reação pouco perceptivel, que a espécie *Sida cordifolia* demonstrou à infecção pelo virus da "clorose infecciosa", dificultou muito a exata determinação, nesta espécie, do "período de incubação", isto é, do tempo que o virus levou para passar ao componente da enxertia, antes sadio, e para provocar nele os primeiros sintomas de doença.

b) Embora seja muito pequeno o número de casos positivos de transmissão da "clorose infecciosa" que pudemos observar em cavalos originalmente sadios de *Sida cordifolia*, ele já nos permite

verificar que a infecção nesta espécie se dá após um período de incubação relativamente longo. Foi de 67 dias a média desse período dos 3 casos em que os cavalos de *Sida cordifolia* estiveram em contacto com enxêrtos doentes de *Sida rhombifolia,* e de 84,8 dias dos 6 casos em que garfos doentes de *Sida acuta* serviram de fóco de infecção. Comparando com estes valores as indicações da tabela 5 do nosso trabalho anterior (12, p. 133), podemos verificar que, por exemplo, cavalos sadios de *Sida rhombifolia* já evidenciavam os primeiros sintomas da doença após um contacto médio apenas de 23 dias com garfos doentes de *Sida Glaziovii* (chamada na referida tabela, erradamente, *Sida cordifolia*) ; de 31,1 dias com garfos doentes homoplásticos, e de 48,87 dias com garfos de *Sida acuta.* Pode-se concluir, dessa comparação, que em cavalos de *Sida cordifolia* os primeiros sintomas de "clorose infecciosa" aparecem após um período de incubação duas vezes maior do que em cavalos de *Sida rhombifolia.* E' possivel que essa discrepância entre as espécies se explique em parte por diferenças específicas de suscetibilidade ao virus da "clorose infecciosa". Por outro lado, deve-se também levar em consideração a falta de nitidez dos sintomas manifestados na espécie *Sida cordifolia,* que dificulta muito a diagnose da doença em plantas desta espécie. Existe por isso a possibilidade de se considerarem às vezes como sadias, plantas de *Sida cordifolia* que já se acham na fase inicial do ataque pela "clorose infecciosa". Em todo caso acreditamos que *Sida cordifolia* seja menos suscetivel à infecção da doença por nos estudada do que as espécies *Glaziovii, rhombifolia* e *acuta.*

II) Resultados de ensáios de transmissão experimental da "clorose infecciosa" por meio de enxertias, realizadas com outras espécies de Malváceas.

Em Outubro de 1943 recebemos, por gentileza do Snr. MANUEL ALVES DE OLIVEIRA, agrônomo da Inspetoria das Sêcas, Instituto José Augusto Trindade, São Gonçalo, Paraíba, espécimens de herbário de duas Malváceas, colhidas no Nordeste, mostrando sintomas muito evidentes de "clorose infecciosa". O mesmo técnico também nos mandou sementes colhidas de plantas sadias e doentes de ambas as espécies. Devemos a exata classificação das duas espécies ao Snr. J. F. TOLEDO, chefe da Seção de Fitoteca do Instituto de Botânica de São Paulo, que também neste caso, como já em muitas outras ocasiões, nos prestou a sua valiosa colaboração. De acordo com as informações do Snr. J. F. TOLEDO, as duas plantas em questão pertencem às espécies *Sida purpurascens* SALZM. e *Abutilon crispum* (L.) SWEET, respetivamente. Não tendo encontrado, na literatura (3,

1935), nenhuma indicação relativa à suscetibilidade destas espécies à "clorose infecciosa", resolvemos tentar infecciona-las experimentalmente com o virus dessa doença.

Em 29-10-43 iniciamos um ensáio de germinação com as sementes colhidas de plantas sadias e doentes, a-fim-de averiguar se a doença se transmitia pelas sementes. O poder germinativo das sementes foi muito fraco, mas nenhum dos *"seedlings"*, mesmo dos provenientes de sementes colhidas de plantas doentes, exibiu sintomas de "clorose infecciosa". Este ensáio não forneceu, pois, nenhum elemento em favor da hipótese de uma transmissibilidade do virus da "clorose infecciosa" pelas sementes.

As plantas sadias, das duas referidas espécies, que resultaram destes ensáios de germinação, foram utilizados em experiências de inoculação, por meio de enxertia, com o virus da "clorose infecciosa". Os resultados desses ensáios acham-se reunidos na tabela 2.

Como se pode verificar por esta tabela, a espécie *Sida purpurascens* infeccionou-se com relativa facilidade. Os sintomas apareceram primeiramente nas fôlhas novas e consistiram em manchas cloróticas, angulares, de côr verde-amarela. Na figura *C* da nossa estampa 10 vemos um garfo doente de *Sida acuta carpinifolia* enxertado num cavalo, originalmente sadio, de *Sida purpurascens*. Nas fôlhas novas da haste podada do cavalo já se notam os primeiros sintomas da "clorose infecciosa". Com maior nitidez aparecem esses sintomas na figura *D*, que representa a haste podada do mesmo cavalo, vista com maior aumento. Tambem as fôlhas das plantas espontaneamente infeccionadas com a "clorose infecciosa" de São Gonçalo, Paraíba, apresentaram manchas análogas. Três dessas fôlhas, conservadas em herbário, estão representadas, na estampa 11, fig. *E*.

Nos ensáios em que os cavalos sadios de *Sida purpurascens* tinham sido infeccionadas a partir de enxêrtos de *Sida rhombifolia*, os primeiros sintomas da doença foram observados numa média de 49 dias após a execução das enxertias. No caso em que o enxêrto doente pertencia à espécie *Sida acuta*, o período de incubação foi ligeiramente mais dilatado.

Se bem que estes valores representem as médias de um número muito reduzido de experiências, eles nos indicam que a infecção de *Sida purpurascens* pelo virus da "clorose infecciosa" das Malváceas, pelo menos por meio de enxertia, se efetua com maior facilidade e rapidez do que a de *Sida cordifolia*.

Os resultados conseguidos com a espécie *Abutilon crispum* foram menos conclusivos do que os que acabamos de expor, relativos

à espécie *Sida purpurascens*. Houve um bom pegamento dos garfos doentes de *Abutilon striatum* DICKS. var. *spurium* LYNCH. nos cavalos sadios de *Abutilon crispum* (L.) SWEET e as enxertias se mantiveram muito tempo vivas. Entretanto, não exibiram as fôlhas do cavalo sintomas muito caraterísticos de "clorose infecciosa".

TABELA 2

Ensáio de transmissão por enxertia da "clorose infecciosa" para plantas sadias de *Sida purpurascens* e *Abutilon crispum*

N.º de experiências	Data da experiência	Combinação da enxertia	Método	Pegado		Período de incubação em dias
				com transmissão	sem transmissão	
4-a	31/3/1944	*Sida purpurascens* s. enx. com *Sida rhombifolia* d. . .	garfo	1		50
5-a	23/1/1945	*Sida purpurascens* s. enx. com *Sida rhombifolia* d. . .	garfo	1		48
5-b	23/1/1945	*Sida purpurascens* s. enx. com *Sida acuta* d.	garfo	1		59
4-b	31/3/1944	*Abutilon crispum* s. enx. com *Abutilon striatum* DICKS. var. *spurium* LYNCH.	garfo	1	1	74
4-c	31/3/1944	*Abutilon crispum* s. enx. com *Sida rhombifolia* d. . .	garfo		1	
5-c	23/1/1945	*Abutilon crispum* s. enx. com *Abutilon striatum* DICKS. var. *spurium* LYNCH.	garfo	1		48

Comparando os cavalos de *Abutilon crispum*, enxertados com fócos da "clorose infecciosa", com testemunhas garantidamente sadias, pudemos verificar, nas fôlhas dos porta-enxêrtos, apenas uma clorose generalizada, que se mostrava mais acentuada no limbo, entre as nervuras secundárias.

Não observamos, porem, nas fôlhas, nenhuma mancha de contornos definidos. Achamos este resultado interessante, porque nos espécimens do herbário desta planta, que o Snr. MANUEL ALVES DE OLIVEIRA nos tinha mandado juntamente com as sementes, podem-se distinguir manchas anulares do tipo normalmente observado em *Sida* e *Abutilon*. Queremos crêr, por isso, que talvez existam diver-

sas variantes do virus da "clorose infecciosa" e que a com que executamos os nossos ensáios não provoque, em *Abutilon crispum*, os mesmos sintomas que a variante disseminada em certa zona do Nordeste. Achamos portanto possivel que o aparecimento da clorose generalizada nas nossas plantas experimentais efetivamente represente um sintoma de "clorose infecciosa", provocado, porem, por uma variante do virus não coincidente com a que ocorre no Nordeste. Resta, no entanto, ainda ser provada a existência de virus nesses cavalos.

Quanto aos sintomas observados em *Abutilon crispum*, a nossa fig. *F* da estampa 11 mostra, na fila inferior, duas fôlhas retiradas do herbário, de uma planta de *Abutilon crispum* colhida na Paraíba e espontaneamente infeccionada com a doença, e na fila superior duas fôlhas cloróticas de um cavalo desta espécie, cultivado na nossa estufa e que durante mêses tinha ficado em contacto, por enxertia, com um enxêrto doente de *Abutilon spurium*. Nota-se muito bem nessa fotografia, a diferença existente entre o efeito da infecção espontânea e o da experimental.

III) Tentativas de transmissão da "clorose infecciosa" das Malváceas por meio de *Cuscuta*.

Desde que iniciamos os nossos estudos sôbre a "clorose infecciosa" das Malváceas, consideramos de suma importância averiguar se o agente causador desta doença pode ser transmitido de plantas doentes para sadias por um método diferente do da enxertia. Impôs-se a necessidade de atacar esse problema, porque a transmissibilidade por enxertia não pode explicar, de modo algum, a rápida disseminação da doença entre as Malváceas que vegetam em condições naturais. Com efeito, já muitos autores anteriormente consideraram incompreensivel o modo de disseminação natural dessa doença e chegaram à aventar a hipótese de uma constante geração espontânea (endógena) do virus dentro de cada planta atacada. E' por isso que KUNKEL (8, 1943, p. 69) achou que a questão da disseminação natural da "clorose infecciosa" fosse um dos problemas não resolvidos da virologia.

Uma grande parte do enigma da disseminação da "clorose infecciosa" foi desvendada, há pouco, pela descoberta de um inséto vetôr dessa doença, por ORLANDO e SILBERSCHMIDT (9, 1945). Por outro lado, não se conseguiu, até agora, a transmissão experimental da doença por meio de suco, isto é, pelo único método que permitiria estudar com facilidade as qualidades do agente causador da doença, "in vitro".

Diante dessa grande dificuldade de transmitir a doença por meios mecânicos, achamos de interesse verificar se a "clorose infecciosa" podia ser transmitida por parasitas fanerógamos do gênero *Cuscuta*.

Este processo idealizado por BENNET (1, 1940) e logo depois experimentado por JOHNSON (1941), mostrou-se desde o início eficiente não só para o estudo de grupos de virus transmissíveis também por suco (mosáico do pepino, mosáico do fumo), mas ainda nos trabalhos com outros (2, 5; 1944, 1941) que nunca ou só dificilmente, podem ser propagados por meios mecânicos (*curly top*" da beterraba, "*aster yellow*" e outros).

Ultimamente, KUNKEL (8, 1943) conseguiu mesmo transmitir, por esse mesmo método, certos virus, que antes podiam ser transmitidos unicamente por enxertia. Trata-se das doenças "*rosette*", do pessegueiro, "*witch's broom*", da batatinha, e "*cranberry false blossom*".

Assim nutrimos a esperança de que a "clorose infecciosa", comparada frequentemente com as doenças deste grupo, devido à dificuldade da sua transmissão mecânica, talvez pudesse ser passada para plantas sadias por meio deste artifício.

A espécie de *Cuscuta* empregada em nossos ensáios foi classificada por J. F. TOLEDO, do Instituto de Botânica, como sendo *Cuscuta racemosa* MART. E' verdade que nas transmissões positivas, levadas a efeito principalmente por autores americanos, tinham sido utilizadas outras espécies de *Cuscuta*, especialmente *C. camprestris*, *C. subinclusa* e *C. californica*.. Mas KUNKEL (8, 1943, p. 73) não duvidou da possibilidade de aproveitarem-se também as demais espécies de *Cuscuta* para os estudos de transmissão de virus. Quanto ao método empregado para submeter as plantas experimentais a uma eventual infecção, servimo-nos, na maioria dos nossos ensáios, do seguinte:

Ajustamos sôbre uma malvácea nitidamente doente um fio de *Cuscuta* de 10 até 15 cm de comprimento, esperando em seguida o tempo necessário até a formação de haustórios da parte do parasita. Depois ligamos a ponta do fio à planta sadia a ser inoculada, aguardando outra vez, nesta planta, o estabelecimento de ligações firmes entre parasita e hospedeira, as quais são indicadas pelo aparecimento dos haustórios. Consideramos o aparecimento dos haustórios na planta hospedeira a ser inoculada como início do suposto processo de inoculação experimental.

Nos ensáios que se seguiram, destacamos fios de *Cuscuta* de plantas doentes, nas quais esse parasita já se tinha, ha tempo, firme-

mente estabelecido, colocando-os depois sôbre as plantas a serem inoculadas. A única diferença entre os dois métodos consistiu na falta, no segundo caso, de uma ligação contínua, durante a experimentação, entre o fóco e a planta a ser inoculada, por fios de *Cuscuta*.

Serviram para os nossos ensáios de 7/1, 26/1, 10/2, 8/3, 26/4, 6/7 e 25/7 1944, como fócos de infecção, plantas doentes de *Sida rhombifolia* L.. Tentamos inocular, no curso dessas experiências, 43 plantas sadias de *Sida rhombifolia* e 10 de *Sida Glaziovii*, tendo observado a formação de haustórios no hospedeiro em 25 plantas de *Sida rhombifolia* e em 4 de *S. Glaziovii*. Depois de termos verificado a formação de haustórios sôbre o hospedeiro a ser inoculado, mantivemos as plantas normalmente em observação ainda durante 3 mêses. Para dar uma idéia mais exata do procedimento nestes ensáios, vamos fazer aqui, de acordo com os nossos protocolos, a descrição de um exemplo típico de uma dessas tentativas de transmissão.

a) 6/7/44 *Sida rhombifolia*, doente N.º 1594, parasitada por *Cuscuta* que nela já estabeleceu haustórios.
11/7/44 *Sida rhombifolia*, sadia, N.º 1782, ligada por fios de *Cuscuta* com planta N.º 1594: já se mostra parasitada (haustórios).
4/9/44 ——— 1782, completamente coberta por *Cuscuta*, sem sintomas.
20/9/44 ——— 1782, continua sem sintomas.
11/10/44 ——— 1782, morreu devido ao ataque por *Cuscuta*.

b) 6/7/44 *Sida rhombifolia*, doente, N.º 1677, parasitada por *Cuscuta* (haustórios) e ligada à *Sida rhombifolia* sadia, 1783.
11/7/44 ——— 1783, formação de haustórios de *Cuscuta* em *Sida* 1783.
18/7/44 ——— 1783, sem sintomas.
4/9/44 ——— 1783, sem sintomas.
20/9/44 ——— 1783, sem sintomas.
11/10/44 ——— 1783, sem sintomas.

c) 6/7/44 *Sida rhombifolia*, doente, N.º 1512, parasitada por *Cuscuta* (haustórios) e ligada a *Sida rhombifolia* sadia 1785.
24/7/44 ——— 1785, sem sintomas.
31/7/44 ——— 1785, *Cuscuta* parcialmente eliminada, planta sem sintomas.
2/2/45 ——— 1785, sem sintomas.

Tanto neste como nos outros ensáios relativos à transmissão da "clorose infecciosa" por *Cuscuta* não pudemos observar resultados positivos. Parece, pois, que pelo menos as espécies de plantas hospedeiras por nós examinadas não podem ser, por meio de *Cuscuta racemosa*, contaminadas pelo virus da "clorose infecciosa".

IV) Observações complementares referentes à passagem da "clorose infecciosa" das Malváceas por meio de sementes.

Em nosso trabalho anterior (12, 1943, p. 120) tinhamos expendido a opinião de que, "pelo menos no gênero *Sida*, a "clorose infecciosa" não é transmitida pelas sementes". Essa opinião ficou tambem confirmada pelas observações em novas semeaduras organizadas com sementes de plantas doentes.

Com relação à transmissibilidade, por sementes, do virus da "clorose infecciosa" no gênero *Abuliton*, não tinhamos chegado, no citado trabalho, a uma conclusão definitiva. Justifica-se, aliás, um exame muito cuidadoso desta questão, porque ha muita controvérsia na literatura, relativamente à transmissibilidade, pelas sementes, do virus da "clorose infecciosa" no gênero *Abutilon*.

Nem mesmo KEUR (6, 7; 1933, 1934), que demonstrou, pela primeira vez, que de fato *"seedlings"* descendentes de plantas doentes de *Abutilon* podem encerrar o virus da doença, notou o mesmo comportamento nas progênies de todos os cruzamentos de *Abutilon*. Verificou, por exmplo, que do cruzamento entre *Abutilon striatum* var. *Thompsonii* e *Abutilon Mülleri* resultaram 536 plantas, das quais 249 apresentavam variegação. De 4 destas plantas variegadas a clorose podia ser transmitida, por enxertia, a enxêrtos de pigmentação verde normal e suscetíveis, de *Abutilon regnellii*. Numa outra experiência do mesmo autor, por outro lado, plantas de *Abutilon regnellii* foram infeccionadas por enxertia com garfos de exemplares exibindo sintomas de "clorose infecciosa". As sementes colhidas destes cavalos infeccionados deram origem a 969 plantas sem o menor sintoma da doença.

De acordo com esse resultados, parece que a transmissão de virus pelas sementes, no gênero *Abutilon*, não é fenómeno muito frequente, e depende ou das espécies de plantas hospedeiras fornecedoras das sementes, ou da variante do virus examinada, ou de ambos esses fatores.

Nas nossas próprias experiências, as plantas infeccionadas de *Abutilon striatum* DICKS. var. *spurium* LYNCH foram expostas a condições de polinisação espontânea. Não se encontravam na visinhança plantas de outras espécies de *Abutilon*. Colhemos, em sacos separados, as sementes de diversas plantas doentes, que foram tambem separadamente, e em estufa à prova de insetos, submetidos a ensáios de germinação. Apezar do poder germinativo geralmente muito fraco, destas sementes, pudemos fazer algumas observações comparativas a respeito da descendência de plantas doentes.

Em 27/9/43 foram submetidas 20 sementes da planta doente N.º 803, de *Abutilon striatum* DICKS. var. *spurium* LYNCH, à prova de germinação. Deste ensáio resultaram 5 "seedlings", que chegaram pouco a pouco à demonstrar grande diferenças entre si, não só quanto ao crescimento, mas ainda à forma das fôlhas. A nossa figura *G* da estampa 12, tirada em 2/3/44, ilustra bem as grandes diferenças existentes entre duas plantas deste mesmo lote. O exemplar que na fotografia se acha em baixo é caracterizado por fôlhas profundamente lobadas e exibiu tambem algumas manchas, pouco definidas, de clorose. A planta de cima, como os demais "*seedlings*" da mesma progênie, foram consideradas sadias.

Com o decorrer do tempo as diferenças no desenvolvimento e no aspéto das plantas se acentuaram. A nossa figura *H* da estampa 12, fotografada em 16/7/45, mostra 2 plantas de *Abutilon spurium* provenientes do mesmo ensáio de germinação de 27/9/43. Enquanto a planta à esquerda, na data em que a fotografia foi tirada, tinha alcançado um comprimento de 2 metros e se achava munida de numerosas fôlhas bem sadias, expandidas, profundamente lobadas, media a outra menos de 30 cm e distinguia-se por uma ramificação excessiva e fôlhas enrugadas de contorno irregular e bordos virados para baixo. Estas fôlhas exibiam tambem manchas cloróticas pouco definidas.

A-fim-de verificar se os "*seedlings*" caraterizados por essas deformações e por manchas cloróticas mal definidas das fôlhas continham de fato o virus da "clorose infecciosa", e se, por outro lado, os companheiros isentos de sintomas eram suscetíveis a uma nova infecção, executamos em 17/3/44 uma série de enxertias.

Três dos "*seedlings*" suspeitos de encerrar o virus da "clorose infecciosa" serviram de cavalos para enxêrtos garantidamente sadios de *Abutilon striatum*.

Quatro outros "*seedlings*" por nós considerados sadios, foram enxertados com garfos seguramente doentes, de *Abutilon spurium*. Todas estas enxertias pegaram e ficaram durante um ano em observação.

Nas 3 plantas do primeiro grupo não se manifestaram, durante todo esse período, sintomas de "clorose infecciosa" nos garfos originalmente sadios.

Todos os 4 cavalos da segunda série contrairam a doença após um período médio de incubação de 25 dias.

Embora esses poucos resultados não nos permitam tirar uma conclusão definitiva, eles pelo menos não corroboram a suposição de que a variante da "clorose infecciosa" por nós estudada seja transmitida na espécie *Abutilon striatum* DICKS. var. *spurium* LYNCH, pelas sementes.

SUPPLEMENTARY OBSERVATIONS ON THE EXPERIMENTAL TRANSMISSION OF THE "INFECTIOUS CHLOROSIS" OF MALVACEAE

Abstract

1) This paper is, in the first place, intended to correct the classification of one of the species of Sida, which had been used in our previous experiments on the experimental transmission of the "infectious chlorosis" of the Malvaceae (12). The material considered there erroneously as being of the species Sida cordifolia L., belongs, as matter of fact, to the species Sida Glaziovii K. Schum. We are indebted for this enlightenment as well as for the classification of the two species in question to Prof. H. Monteiro Filho, of the Escola Nacional de Agronomia at Rio de Janeiro.

2) Our experiments on the susceptibility of the real Sida cordifolia to the virus of the "infectious chlorosis" revealed, that some of the graft-infected plants of this species displayed symptoms of the "infectious chlorosis". These symptoms, however, were not conspicuous (Plate 9, fig. A and B) and were shown only by one, or, at most, by few leaves distributed irregularly along the shoot of the infected plants. After a short time the shoot tips continued producing symptomless leaves. Comparing this behavior with that of Nicotiana tabacum infected with the virus of tobacco-ringspot (Price W. C., 10,11), we may suppose, that Sida cordifolia is characterized by the "carrier"-type of acquired immunity, or, according to Wallace J. M. (13) by "acquired tolerance". The results of all our experiments with Sida cordifolia are condensed in table 1 (pg. 51).

3) We were able to extend our experiments to the species Sida purpurascens Salzm. and Abutilon crispum (L.) Sweet, owing to samples of plant material and of seeds, which had been sent to us by the kindness of Mr. M. A. Oliveira, agronomist of the Instituto José Augusto Trindade at São Gonçalo, Paraiba. Only in the first of these species could we easily induce symptoms of the "infectious chlorosis". Healthy stocks of Sida purpurascens, grafted with diseased scions of Sida rhombifolia or Sida acuta, produced leaves displaying typical

symptoms of the "infectious chlorosis" after a mean period of incubation of 50 days (table 2 and plate 10, fig. C and D.) The leaves of plants of the same species, from Paraiba, spontaneously infected with the "infectious chlorosis", showed similar symptoms (Plate 11, fig. E.). Healthy stocks of Abutilon crispum, grafted with infected scions of Abutilon striatum Dicks. var. spurium Lynch, produced leaves exhibiting only a slight general chlorosis, quite different from the symptoms displayed by the spontaneously infected plants. Perhaps our strain of the virus of "infectious chlorosis" is not identical with the strain common in the State of Paraíba (table 2, and plate 11, fig. F.).

4) We did not succeed in transmitting the "infectious chlorosis" from diseased hosts of Sida rhombifolia to healthy plants of the same species or of Sida Glaziovii by means of Cuscuta racemosa Mart.

5) In spite of the occurrence of dwarfed and malformed seedlings among the generic progeny of diseased plants of Abutilon striatum Dicks. var. spurium Lynch (Plate 12, fig. G and H.), those seedlings could not be proved to harbor the virus of the "infectious chlorosis".

BIBLIOGRAFIA

1 — Bennet, C. W. — 1940 — Acquisition and transmission of viruses by dodder (Cuscuta subinclusa). *Phytopath.*, **30**: 2.

2 — Bennet, C. W. — 1944 — Studies of dodder transmission of plant viruses. *Phytopath.*, **34**: 905-932.

3 — Cook, M. T. — 1935 — Host index of virus diseases of plants. *The Journal of Agric. of the University of Puerto Rico*, **19**: 315-406 e **20**: 695-729.

4 — Johnson, F. — 1941 — Transmission of viruses by the parasitic activities of dodder. *Phytopath.*, **31**: 13.

5 — Johnson, F. — 1941 — Transmission of plant viruses by dodder. *Phytopath.*, **31**: 649-656.

6 — Keur, J. Y. — 1933 — Seed transmission of the virus causing variegation of Abutilon. *Phytopath.*, **23**: 20.

7 — Keur, J. Y. — 1934 — Studies of the occurrence and transmission of virus diseases in the genus Abutilon. *Bull. Torrey Bot. Club*, **61**: 53-76.

8 — Kunkel, L. O. — 1943 — New hosts as a key to progress in plant virus disease research. Em: *Virus diseases*, published by Cornell University Press, Ithaca, p. 63-82.

9 — Orlando, A. e K. Silberschmidt — 1945 — O vetor da "Clorose infecciosa" das Malváceas. *O Biológico*, S. Paulo, **11**: 139-140.

10 — Price, W. C. — 1932 — Acquired immunity to ring-spot in Nicotiana. *Contributions from Boyce Thompson Institute*, **4**: 359-403.

11 — Price, W. C. — 1940 — Generalized defense reactions in plants. *The American Naturalist*, **74**: 117-128.

12 — SILBERSCHMIDT, K. — 1943 — Estudos sobre a transmissão experimental da "Clorose Infecciosa" das Malváceas. *Arq. Instituto Biológico*, S. Paulo, 14: 105-156.

13 — WALLACE, J. M. — 1939 — Recovery from and acquired tolerance of curly top in **Nicotiana tabacum**. *Psytopath.*, 29: 743-749.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 9

Fig. *A* — Manchas claras, arredondadas, em uma fôlha de um cavalo de *Sida cordifolia*, enxertado em 10/4/1944 com garfo doente de *Sida acuta carpinifolia*. As outras fôlhas do cavalo não mostram sintomas. (Fot. Mazza 16/8/1944).

Fig. *B* — Manchas claras, arredondadas, em algumas fôlhas de um cavalo de *Sida cordifolia*. Nota-se nas fôlhas do cavalo, também, um ligeiro enrugamento. (Fot. Mazza 16/8/1944).

Estampa 10

Fig. *C* — Cavalo de *Sida purpurascens* enxertado em 23/1/1945 com um garfo doente de *Sida acuta carpinifolia*. Os sintomas no cavalo (haste podada) vêm-se em detalhe na fotografia seguinte. (Fot. Mazza 19/4/1945).

Fig. *D* — Manchas típicas de "clorose infecciosa" no cavalo de *Sida purpurascens* enxertado em 23/1/1945 com um garfo doente de *Sida acuta carpinifolia* e representado na fig. *C*. (Fot. Mazza 21/5/1945).

Estampa 11

Fig. *E* — Manchas de "clorose infecciosa" apresentadas por fôlhas de plantas espontâneamente infeccionadas de *Sida purpurascens*, colhidas pelo Snr. M. A. de Oliveira, em São Gonçalo, Paraíba. (Fot. Mazza, aumento 1,5 ×, 9/8/1945).

Fig. *F* — Fôlhas de *Abutilon crispum*, provenientes de plantas espontâneamente infeccionadas com a "clorose infecciosa" e colhidas pelo Snr. M. A. de Oliveira, em São Gonçalo, Paraíba (fileira inferior) e de uma planta da mesma espécie cultivada em nossa estufa e que tinha sido enxertada, alguns mêses antes, com um garfo de planta doente de *Abutilon spurium* (fileira superior). (Fot. Mazza 18/9/1945).

Estampa 12

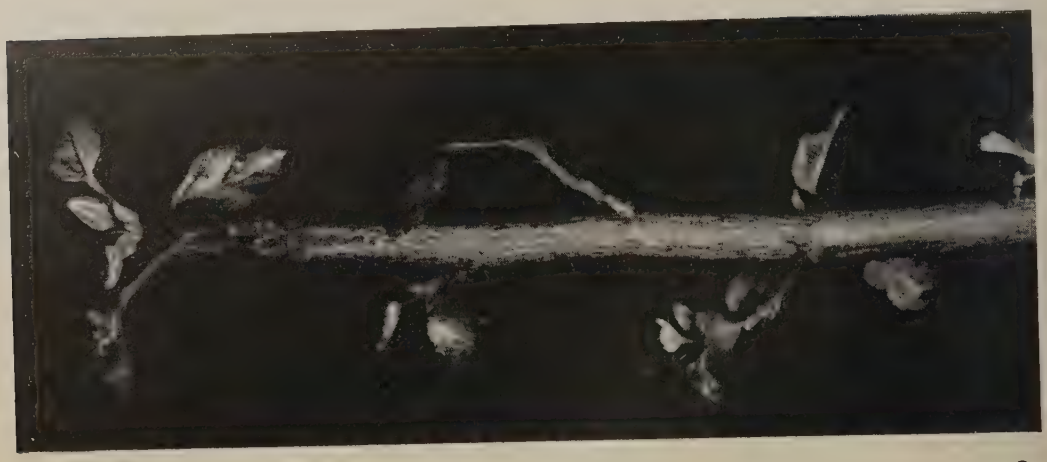
Fig. *G* — Dois "seedlings" originários da mesma planta-mãe, de *Abutilon spurium*, evidenciando diferenças acentuadas entre si, quanto à forma do limbo das fôlhas. Além disso, a planta de baixo exibe ligeiras manchas cloróticas e deformações que lembram sintomas da "clorose infecciosa". (Semeadura de 27/9/1943. Fot. Mazza 2/3/1944).

Fig. *H* — Dois outros *"seedlings"* de *Abutilon spurium*, resultantes de um ensaio de germinação, efetuado em 27/9/1945, e que exibem entre si grandes diferenças de desenvolvimento e de conformação das fôlhas. (Fot. Mazza 16/9/1945).

———o———

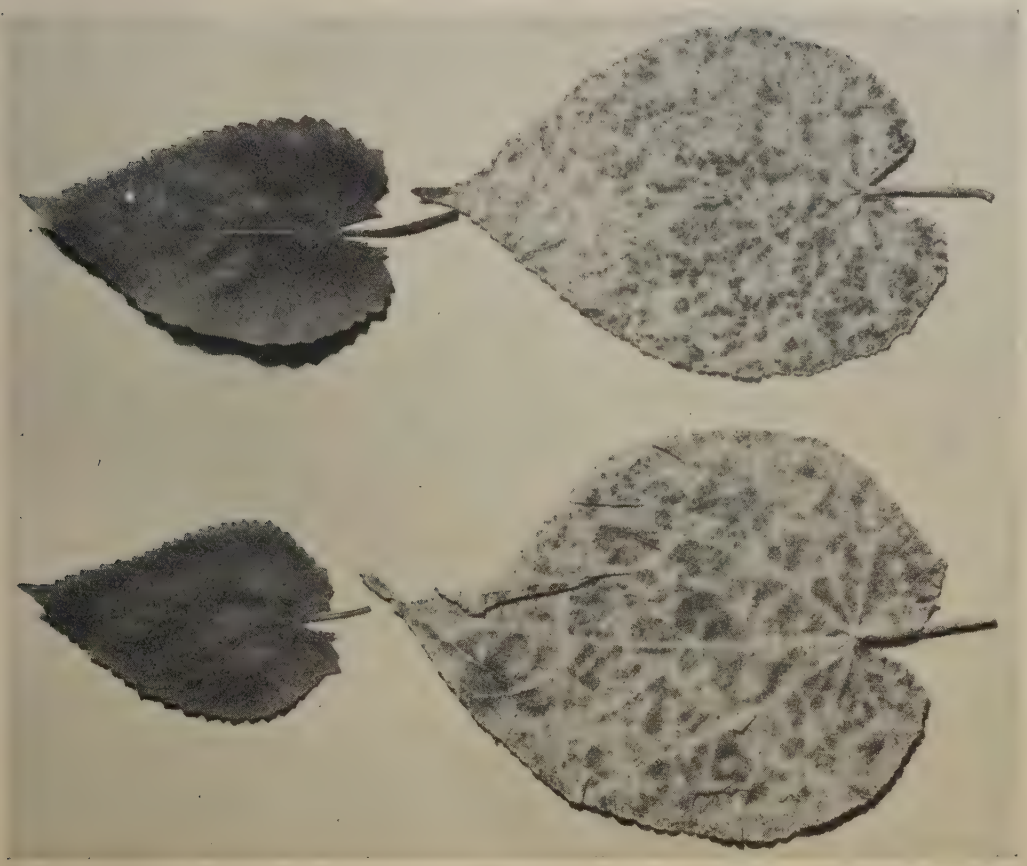
A

B



D

C



F

E

G H

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DO GÊNERO "METAPOLYBIA DUCKE, 1905" (HYM. VESPIDAE)

POR

R. L. Araujo

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 12 figuras no texto e estampas 13-14

Metapolybia DUCKE, 1905

DUCKE, A., 1905, Rev. d'Ent., Caen, 24:10, 17; idem, 1905, Bol. Mus. Pará, 4 (4): 659, 671; idem, 1907, l. c., 5: 163; idem, Ann. Mus. Nat. Hung., 8:488; idem, 1914, Zool. Jahrb., Syst., 26 (2/3): 305, 306-7, 313, 314; idem, 1918, Rev. Mus. Paul., 10: 331 (separata p. 19), 367 (separata p. 55); BEQUAERT, J., 1944, Bull. Mus. Comp. Zool., 94 (7): 253, 276-7.

Este gênero foi criado por DUCKE para receber *Polybia pediculata* SAUSS., 1854. Em 1912 SCHULZ examinou os tipos de *Eumenes cingulata* FABR., 1804 e reconheceu ser-lhe sinônima a espécie de SAUSSURE. A verificação de SCHULZ permaneceu inteiramente despresada e somente em 1944 BEQUAERT recolocou em ordem a nomenclatura daquela espécie. Já em 1905 DUCKE sugere que "la *suffusa* FOX *(Polybia)* doit aussi appartenir à ce genre" e em 1910 nêle incluiu-a como forma extrema de colorido de *pediculata*. Tambem nesta ocasião reconheceu como sinônimo *Tatua decorata* GRIBODO, 1896. Em 1944 BEQUAERT separa como espécies distintas *suffusa* e *cingulata* e, havendo examinado o material de Fox, reconhece ser *M. pediculata* var. *rufopicta* DUCKE, 1910, mero sinônimo de *M. suffusa*. No presente estudo descrevemos circunstanciadamente o genótipo; reconhecemos *unilineata* IHERING, 1904 como espécie e acrescentamos ao gênero mais duas espécies novas; de uma delas é descrito tambem o ninho. As diagnoses específicas procuram salientar as diferenças com relação ao genótipo.

Diagnose do gênero: Polibiíneos de ocelos normais, palpos labiais de 4 artículos (destituidos da cerda característica de outros gêneros) e maxilares de 6 artículos; margem posterior do postescutelo em ângulo obtuso; pecíolo abdominal muito longo e delgado, quase do comprimento do tórax e com os tubérculos espiraculares salientes; lóbulos tarsais simétricos. Nidificação fragmocítara imperfeita.

Genótipo: *Metapolybia cingulata* (FABR., 1804) SCHULZ, 1912. (= *Eumenes cingulata* FABR., 1804). Por monotipia original.

Distribuição geográfica: E' gênero próprio da Região Neotrópica, extendendo-se desde o México até a Argentina e incluindo também as Antilhas.

CHAVE PARA AUXILIAR A IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *METAPOLYBIA*

1 — Fêmeas, antenas com 12 segm.; abdomen com 6 2
. — Machos, antenas com 13 segm.; abdomen com 7 6
2 — Propódeo dorsalmente estriado 3
. — Propódeo sem traços dessa estriação 4
3 — Ângulos umerais do pronoto bem salientes; margem posterior do pronoto alargada no centro; propódeo sulcado em toda a extensão . . . . . *unilineata* (IHERING)
. — Ângulos umerais do pronoto mais fracamente entumescidos; margem posterior estreitada no centro; propódeo deprimido nos dois terços inferiores . . . . . *cingulata* (FABR.)
4 — Fronte e vértice conspicuamente puncturados; coloração negra com maculações amareladas 5
. — Fronte e vértice ásperos, as puncturas quase imperceptíveis; coloração negra reduzida; castanho-avermelhada e maculações amareladas profusas . . . . . *suffusa* (FOX)
5 — Genas mais largas que o olho, superiormente pouco estreitadas; mesonoto pouco mais largo que longo . . . *bromelicola*, n. sp.
. — Genas mais estreitas que o olho, superiormente bastante estreitadas; mesonoto tão largo quanto longo . . . *azteca*, n. sp.
6 — Propódeo dorsalmente estriado 7
. — Propódeo sem traços dessa estriação 8
7 — Puncturação do tórax inconspícua; depressão propodeal larga, profunda, com margens salientes . . . *unilineata* (IHER.)
. — Puncturação do tórax patente, forte; depressão propodeal rasa, os lados do propódeo arredondados, não salientes . . . . . *cingulata* (FABR.)
8 — Fronte áspera, opaca, da puncturação conspícua; mesopleuras opacas, com puncturação patente . . . . . *bromelicola*, n. sp.
. — Fronte lisa, brilhante; puncturação inconspícua; mesopleuras brilhantes com puncturação quase imperceptível . . . . . *suffusa* (FOX)

Metapolybia cingulata (FABR., 1804)

Estampa 13, fig. *A* e *C* e est. 14, fig. *E*

Eumenes cingulata FABR., 1804, Syst. Piez., p. 287, n.º 13; DALLA TORRE, 1894, Catal. Hymen., 9: 20.

Polybia pediculata SAUSS., 1854, Ét. Fam. Vesp., 2: 205, n.º 50; est. 26, figs. 7, 7a-b; MOEBIUS, K. A., 1856, Abh. naturw. Ver. Hamb., 3: 136; est. 11; idem, 1856, Arch. Naturg., 22 (1): 330; est. 12, fig. 6; SMITH, F., 1857, Catal. Hymen. Brit. Mus., 5: 131; idem, 1862-4, Trans. Ent. Soc. Lond., (3) 1: 39; DALLA TORRE, 1894, Catal. Hymen., 9: 165; FOX, W., 1898, Proc. Acad. Nat. Sci. Philad., p. 449; IHERING, R., 1904, Rev. Mus. Paul., 6: 184, 251; DUCKE, A., 1905, Bol. Mus. Pará, 4 (2/3): 341, 349; SCHULZ, W. A., 1905, Hymen.-Stud., Hym. Amaz., 2: 127-8; CAMERON, P., 1912, "Timehri" (Jr. Agr. & Comm. Soc. Brit. Guiana) p. 208 ("*pedunculata*").

Metapolybia pediculata (SAUSS.), DUCKE, A., 1905, Rev. d'Ent., Caen, 24: 17; idem, 1905, Bol. Mus. Pará, 4 (4): 671; idem, 1907, *l. c.*, 5: 163; idem, 1908, Rev. d'Ent., Caen, 27: 86; idem, 1910, Ann. Mus. Nat. Hung., 8: 488; BODKIN, G. E., 1917, Trans. Ent. Soc. Lond., pts. 2-4, p. 308-9 (ninho);

DUCKE, A., 1918, Rev. Mus. Paul., 10: 331, 367; BERTONI, A. W., 1918, An. Cient. Parag. (2) 3: 184, 204; idem, 1911, An. Mus. Nac. Buenos Aires, 22 (ser. 3, t. 15): 117; RAU, P., 1933, "The Jungle Bees and Wasps of Barro Colorado Island (Panama)", pp. 46-56, figs. 11-17 (ninho, etc.).

Tatua decorata GRIBODO, 1896, Miscell. Ent., 4: 13; DUCKE, A., 1910, Ann. Mus. Nat. Hung., 8: 488 (sinonímia) (Cf. comentário em *M. unilineata*).

Metapolybia cingulata (FABR.), SCHULZ, W. A., 1912, Berl. Ent. Ztschr., 57: 88, 101; WEYRAUCH, W., 1942, Bol. Mus. Hist. Nat. "Javier Prado", 6 (n.º 20): 58, fig. 5G; idem, 1943, *l. c.*, 7 (ns. 24/25): 76, 86; BEQUAERT, J., 1944, Bull. Mus. Comp. Zool., 94 (7): 276-7.

Redescrição:

♀ — Cabeça, vista de frente, ligeiramente mais larga que alta, a linha do vértice quase direita; vista de cima, pouco mais larga que o mesotórax, quase três vezes mais larga que longa, fortemente côncava atrás; recoberta de pilosidade microscópica, recumbente, esbranquiçada, não aveludada. Fronte pouco abaúlada, irregular e densamente puncturada, adensando-se as puncturas para junto do vértice, algumas confluentes, todas providas de uma cerda cujo comprimento não ultrapassa o diâmetro da punctura, os intervalos entre as puncturas ásperos, coriáceos. Vértice pouco sinuado, puncturação menos densa que a da fronte; triângulo ocelar (LOO:LOP::10:4) muito pouco alongado e em cômoro fracamente elevado. Genas quase da largura dos olhos, ângulo superior ligeiramente saliente e, no meio, em declive, estreitadas no terço inferior onde a largura é apenas 2/3 da do centro; finamente coriáceas, puncturação esparsa, mais regular e menos conspícua que a da fronte. Clípeo fracamente convexo, as zonas ínfero-laterais quase planas; cerca de uma vez e meia mais largo que alto; lóbulo mediano distal em ângulo obtuso; margem superior côncava; contíguo aos olhos desde metade de sua altura até ao ápice dos lóbulos laterais; sutura látero-superior formando ângulo para atingir a fosseta sub-antenal; sutura sub-antenal muito curta, porem distinta; pouco menos densamente puncturado que a fronte; margem distal impuncturada, brilhante. Espaço óculo-malar praticamente nulo; as genas atingem o ápice dos lóbulos laterais do clípeo em forma de cunha. Olhos normais, salientes, destituidos de pilosidade, um quinto mais afastado ao nível do ocelo anterior que na região central do clípeo; sinus ocular largo, pouco profundo. Mandíbulas do comprimento do primeiro artículo das antenas, inclusive o côndilo; metade basal plana e distal abaúlada; largura basal, 1/4 do comprimento; extremidade côncava; os dois dentes apicais recurvos, o terceiro quasi direito, o interno mais largo, subtriangular, de ponta romba; superfície lisa, brilhante; umas poucas cerdas amarelas esparsas. Palpos labiais de 4 artículos: I sinuado, pouco alargado distalmente, de ápice chanfrado, equivalente em comprimento aos II e III; II cilíndrico, chanfrado distalmente, um terço menor que o I; III um quarto mais longo que largo na extremidade; IV, metade do I, atenuado para as extremidades; II-IV providos de diminutas cerdas erectas, dispersas, mais abundantes no último. Palpos maxilares de 6 artículos: I robusto, encurvado na base; II-V sub-iguais em comprimento, distalmente engrossados; VI um pouco mais longo que o I, de extremidades atenuadas; todos os artículos dispõem de grupos de diminutas cerdas erectas, principalmente abundantes no ápice do último. Antenas, vistas sob grande aumento, recobertas por pilosidade clara, muito curta, pouco densa e recumbente; escapo ligeiramente recurvado, muito pouco engrossado distalmente; côndilo globular, duas vêzes mais largo na base; pedicelo de base estreita, ápice alargado, lados convexos; I segmento do flagelo pouco dilatado para o ápice; II quase qua-

drangular; XII apenas estreitado para o ápice terminando em ponta romba, a face superior mais fortemente convexa que a inferior, apenas um pouco mais longo que a largura de sua base; todo o flagelo é suave e gradativamente engrossado para o ápice, sendo sua largura no XI segmento o dobro da base do I.

Tórax, visto de cima, alongado, estreitado para a frente e para trás; visto de lado, obliquamente truncado na frente, afilando-se para trás, um terço mais longo que alto; do escutelo ao propódeo, em declive forte mas não abrupto. Protórax estreitado na frente e fortemente alargado para trás; puncturação menos densa que a do mesonoto; carena pronotal anterior cortante e bem levantada no meio, lateralmente atenuado, provida de cerdas erectas, esparsas e amareladas; próximo à margem ânteroventral eleva-se uma forte carena ("crista"), cortante pela maior parte, côncava atrás, correndo a princípio paralelamente à carena pronotal anterior e depois afastando-se, rebaixando-se e alargando-se perto da margem posterior; lóbulo posterior limitado por carena cortante e sinuada; no ângulo umeral, junto à margem, uma entumescência nítida, arredondada, que ocupa cerca de um terço da margem posterior e é melhor apreciada quando visto o inseto de cima; margem posterior ao centro em ângulo quasi acuminado; linhas laterais sinuadas. Mesonoto aveludado, com puncturação densa, as puncturas bem separadas, rasas; abaúlado, truncado atrás, fortemente estreitado na frente, de contôrno grosseiramente pentagonal, ligeiramente mais largo que longo; sutura notal mediana fraca, não atingindo a zona mais elevada do mesonoto; parapsides retangulares, em declive abrupto; sulcos parapsidais com margem cortante próxima das axilas, atenuadas depois e terminando ao nível do centro das tégulas. Mesopleuras com puncturação densa, nítida, mais forte que a do mesonoto; fortemente abaúladas, salientes; sutura mesopleural bem marcada, mais profunda e mais larga na base, divergindo fracamente da margem de metapleura, formando ângulo para trás e terminando antes da margem e em direção à primeira fosseta da metapleura; sulco episternal mediano, ausente. Mesosterno com puncturação menos forte e menos densa que a das mesopleuras; abaúlado, curta incisão central oblíqua, no ápice; na sutura central os dois dentes mesosternais conspícuos; junto à base da metapleura um pequeno dente arredondado, pouco saliente. Tégulas semiconvexas, circulares na frente, alongadas para trás; finamente coriáceas; axilas pequenas cuneiformes, com a extremidade afilada; cristas escutelares oblíquas, planas. Escutelo com puncturação pouco mais forte que a do mesonoto, principalmente adensada nas saliências laterais; zona estreita inferior e outra mais larga lateral destituidas de puncturação; retangular, quase duas vêzes mais largo que comprido, estreita zona anterior horizontal, o restante em declive forte, abrupto, com larga e fraca depressão central; bolsa escutelar larga, distinta, transversalmente estriada ao fundo. Postescutelo com raras puncturas, mais patentes que as do escutelo, adensadas nas entumescências laterais; duas vêzes mais largo que longo, margens superior bissinuada e a inferior com centro em pequena ponta romba e muito curta; larga depressão central mais profunda do que a do escutelo; depressões metanotais mais rasas que as bolsas escutelares, divididas ao meio por uma carena fraca, porem nítida; metapostnoto saliente, côncavo; segundo peritrema diminuto, fracamente convexo. Propódeo em declive suave, praticamente na mesma inclinação do escutelo e postescutelo; cerdas de dois tamanhos espalhadas pela superfície, as maiores limitadas às partes inferiores; puncturação forte, esparsa, principalmente conspícua nos lados; comprimento, medido sôbre a linha mediana, pouco maior que os do escutelo e postescutelo reunidos; cerca de duas vêzes mais largo

na base que no ápice; depressão central pouco profunda, arredondada, ocupando cerca de dois terços da zona mediana inferior, ao meio e ao fundo da depressão uma fina carena longitudinal, pouco saliente, porem conspícua; vistos de cima, os lados são arredondados, finamente estriados, as estrias fracas, atingindo a depressão mediana e limitadas depois às partes dorsais abaúladas; espiráculo propodeal próximo da margem anterior do propódeo e quasi na mesma direção da carena interna da depressão metanotal; expansões apicais do propódeo delgadas, com as margens lobadas e precedidas por depressão profunda; dentes do propódeo ("válvulas") curtos, encurvados, lisos, brilhantes, formando o seu conjunto reêntrância oblonga de fundo arredondado. Metapleuras com puncturação semelhante à dos lados do propódeo; a zona superior bem menor que a inferior, retangular, com fracas indicações de estriação transversal, rugosas na borda anterior da fosseta; zona inferior trianguliforme, a princípio plana, em seguida convexa do lado do propódeo e fracamente côncava do lado da mesopleura; inferiormente uma pequena expansão semi erecta junto às expansões apicais do propódeo. Asas hialinas, de um fraco lustro amarelado nas células mediana e submediana, a costal um pouco mais obscurecida; nervuras e estigma alar castanho-escuros; a pilosidade microscópica é principalmente densa nas margens apical e costal; uma zona glabra na base da célula anal. Asas anteriores. Células: C estreitíssima, de largura quasi uniforme, apenas ligeiramente estreitada nas proximidades do estigma; M maior que a metade do comprimento da asa, estreitada para as duas extremidades; Sm estreitada ao meio, cerca de metade do comprimento da mediana; D1 alargada na junção das nervuras Ba e Cub; D2 triangular, pouco mais longa que metade da D1; D3 retangular, ligeiramente estreitada e sinuosa na base; Cub1 retangular, duas vêzes mais comprida que larga; Cub2 grosseiramente hexagonal, na base, metade da Cub3, fortemente estreitada para o ápice, recebendo as nervuras Rec1 e 2 na metade distal da base; Cub3 quadrangular, pouco mais comprida que larga, na nervura Cub é 1/3 maior que na R; Cub4 retangular, maior que as duas precedentes reunidas; R alargada na base, estreitada e ligeiramente recurvada para o ápice, equivalente em comprimento à Sm; A quase do comprimento da M, estreitada para as extremidades e alargada no meio; Ap1 elipsóide, maior que a D3; Ap2 de base retangular, porem alargando-se infeiormente; stigma oblongo, quase do comprimento da Cub3. Nervuras: C, Sc e M quasi retas; Sm sinuosa na base, depois largamente convexa, terminando a pouca distância da incisão preaxilar; Bas. ligeiramente curva, coincidindo com a Cub no último têrço do seu comprimento; Cub fortemente irregular principalmente na base da célula Cub2 onde desce bruscamente, recebe ambas as recurrentes a curta distância uma da outra, sobe menos bruscamente até encontrar a TrCub2 e depois da célula Cub4 é apenas indicada; TrCub1 reta, oblíqua; TrCub2 encurvada no centro; TrCub3 sinuada; nervulus curto, a princípio quase direito, dobrando-se depois em ângulo quase reto e interrompido antes de atingir a SubM; do ângulo aí formado nasce a D, que continua até a recurrente, dobra-se então em ângulo agudo e desce sinuosamente até a SubD. Asas posteriores cerca de metade do comprimento das superiores; a franja marginal de pêlos é esparsa logo depois dos hámuli e, adensando-se, atinge o nivel da Cub, e deste ponto em diante os pêlos vão-se distanciando até desaparecerem; lóbulo anal diminuto, e preanal pouco saliente; hámuli fortemente recurvados, diminuindo gradativamente de tamanho, o último às vêzes reto; a série inicia-se exatamente sôbre a inserção de R e termina bem antes da altura da TrC; na maior parte dos exemplares, em número de 7, encontrando-se porem 8 e 6 e, nalguns exemplares, numa

asa, 6 ou 7 e na outra 7 ou 8. Células: M cerca de dois terços do comprimento da asa; SbM cerca de metade da M, alargada para a frente, dilatada inferiormente na junção da A e D; R quase do comprimento da SubM; Cub alargada para a frente e em sua maior extensão apenas esboçada; D1 estreitada na base e fortemente alargada para fora; D2 praticamente inexistente; A ampla, sem limite distal. Nervuras: Cub sinuosa; D curva; A curva, a princípio, e depois reta, terminando a altura da discoidal. Nenhuma das veias atinge o bordo da asa.

Patas anteriores: Coxas com puncturação fraca, pouco densa; largas, cônicas, duas vêzes mais larga na base que no ápice, e carca de metade do comprimento do fêmur; processo basal um terço do comprimento da coxa, robusto, distalmente pouco dilatado, longitudinalmente canaliculado. Trocânteres recurvos, alargados para o ápice, e cerca de metade do comprimento das coxas. Fêmures robustos; face superior côncava e inferior fortemente convexa; internamente uma depressão em forma de sulco na metade apical. Tibias direitas, 3/4 do comprimento dos fêmures, muito pouco atenuadas na base e distalmente pouco engrossadas; ápices chanfrados; esporão tibial sinuoso, dois terços do comprimento do metatarso, colocado ventralmente e ao fundo da incisão tibial; "pente" ocupando mais de 3/4 da margem interna; cerdas apicais duas vêzes mais longas; bordo apical das tíbias guarnecido de cerdas curtas, fortes e espacejadas; inferiormente, do lado de fora, um grupo de cerdas maiores. Metatarsos equivalentes ao comprimento dos 3 últimos segmentos tarsais reunidos, ou pouco mais da metade da tíbia; fracamente encurvados na base e depois direitos, fracamente constricto no meio; dois grupos laterais de cerdas fortes dispostas em linha que se prolonga inferiormente rodeando o ápice; na face inferior numerosas cerdas dispostas em linha; em seguida à excavação basal uma série de cerdas curtas e robustas; escavação basal cerca de 1/3 do metatarso; II segmento tarsal com o lóbulo interno apenas um tanto mais pronunciado; III um pouco mais escavado ao ápice, ambos os lóbulos pronunciados e praticamente simétricos; nestes dois segmentos os lóbulos são providos, apicalmente, de um grupo de cerdas que se extendem até a face inferior; cada um destes segmentos equivale a 1/3 do metatarso; IV segmento profundamente escavado no ápice, de maneira a apresentar lóbulos simétricos maiores que os demais; V cerca do comprimento do III e IV, quasi duas vêzes mais largo no ápice que na base; das garras tarsais a interna um pouco mais recurva no ápice e muito pouco menor que a externa. Patas medianas: Coxas alongadas, cerca de duas vêzes mais compridas que largas, atenuadas para a frente, engrossadas junto à base, cerca de metade do comprimento das tíbias. Trocânteres recurvos, constrictos no têrço do comprimento, alargados para o ápice onde são duas vêzes mais grossos; aproximadamente da metade do comprimento das coxas. Fêmures quasi direitos, apenas ligeiramente engrossados à altura da metade do comprimento, ligeiramente mais longos que as tíbias, fracamente excavados internamente na metade apical. Tíbias ligeiramente curvas na base, fracamente alargadas para o ápice; dos dois esporões, o interno é mais robusto e mais longo; cerdas curtas e espacejadas no ápice. Metatarsos pouco mais longos que a metade da tíbia, fracamente dilatados para a extremidade; cerdas curtas, esparsas, na face inferior; pequenos grupos de cerdas maiores no ápice; maiores que os 3 segmentos seguintes reunidos; II segmento tarsal pouco menor que o último, lóbulo muito pouco pronunciado; III pouco menor que o II, com grupos laterais de cerdas; lóbulos um tanto mais desenvolvidos; IV, o menor, profundamente lobado, os lóbulos simétricos. Patas posteriores: Coxas semelhantes às do II par, porem mais robustas. Trocânteres tambem semelhantes aos demais, porem menos recurvos. Fêmures engros-

sados no início da segunda metade, muito ligeiramente recurvos. Tíbias de cerca do comprimento dos fêmures, distalmente um tanto alargadas, recurvas junto à base; na altura da curva basal, interna e superiormente, uma saliência alongada, baixa, em seguida ligeira curvatura da tíbia; esporão interno sinuoso, achatado, o dobro do externo; poucas cerdas apicais e franja de pêlos em toda a margem interna. Metatarsos fracamente curvos na base distalmente muito pouco alargados; cerdas esparsas na face inferior, pequeno grupo de cerdas mais fortes no ápice; II segmento muito fracamente alargado para o ápice, pouco maior que o III; grupos de cerdas laterais; III um pouco mais dilatado para a extremidade; IV profundamente lobado, lóbulo externo apenas ligeiramente mais robusto que o interno; V alargado para o ápice; garras simétricas.

Abdomen - longipeciolado e, depois, cordiforme; I segmento finamente coriáceo; demais segmentos mais grosseiramente coriáceos com puncturação irregular, forte e densa, pouco profunda, mais adensada nas margens; pecíolo do comprimento da tíbia posterior e tambem do comprimento do escutelo, postescutelo e propódeo reunidos, ou sejam 2/3 do comprimento do tórax; cerca de 2 vêzes mais largo no ápice que na base; visto de cima, as duas expansões laterais, basais, somadas equivalem à metade da largura do pecíolo; fenda de inserção dos tendões dos elevadores do abdomen arredondada no ápice, oblonga, estreitando-se fortemente para a base, onde seus lados se elevam e se unem em carena até a margem do pecíolo; dos lados desta carena saem pêlos fortes; depois da expansão basal o pecíolo tem os lados paralelos até os tubérculos espiraculares, que são salientes e estão colocados logo depois da metade proximal; depois dos tubérculos os lados do pecíolo são côncavos, ligeiramente divergentes e em seguida arredondados, formando a dilatação distal; visto de perfil, a metade proximal de lados muito fracamente divergentes; porem antes dos tubérculos a divergência se acentua; a linha superior, curva, sobe fortemente e depois desce, reta, para o ápice; a linha inferior sobe fracamente até bem junto do ápice, onde sua parte terminal é reta; depois de sua máxima dilataçãço o pecíolo vai-se estreitando e, no ápice, de perfil, tem aproximadamente a mesma largura da base; junto da base, cerca de sete vêzes, e na dilatação, cerca de tres vêzes mais estreito que o II segmento; II segmento estreito na base, logo subitamente alargado, pouco mais largo que comprido, tergito menos globuloso que o esternito; estigma junto à margem tergal e a meia distância entre base e ápice; os segmentos seguintes transversais, diminuindo progressivamente; VI coniforme, tergito triangular, apicalmente em ponta romba, cerdas curtas e esparsas na parte livre; na margem apical uma franja densa de cerdas ainda mais curtas; esternito mais alongado, extremidade afilada; no têrço distal cerdas esparsas, mais longas que as do tergito; franja apical menos conspícua. Aguilhão farpado (6-8 farpas).

Coloração: Cabeça negro-fosca; mandíbulas e antenas ferruginoso-escuras; extremidade do clípeo e mandíbulas lustrosas; maculações amarelas: mancha oblonga junto à margem superior da base das mandíbulas; mancha alongada na zona inferior das órbitas internas; mancha pequena arredondada, superiormente côncava no ápice do clípeo, e duas outras pequenas, alongadas, junto à margem inferior e próximas dos lóbulos laterais deles. Tórax negro, com certo lustro aveludado, fraco no mesonoto; maculações amarelas: tarja no bordo posterior do protórax, pequena mancha arredondada ao alto da mesopleura, a qual às vêzes se alonga junto da sutura mesopleural; mancha alongada na margem superior do postescutelo, estreitada medianamente, por vêzes interrompida no meio; as

expansões apicais do propódeo e mancha, na base dos "dentes" apicais; patas castanho-claras. Abdomen castanho bem escuro; maculações amarelas: bordos dos tergitos I e II e mais fracamente os bordos dos segmentos III-V. As maculações amarelas desta espécie variam bastante e o esquema acima apresentado pode ser tomado como tipo médio; ha casos, na mesma população, de indivíduos muito mais ou muito menos ricamente ornados de amarelo.

Comprimento (cabeça + tórax + tergitos I e II): 7,5—8 mm; asa anterior 6,5 mm.

♂ — Cabeça pouco mais larga que alta. Fronte com brilho sedoso mais fraco que o do clípeo. Vêrtice quasi em linha reta, triângulo ocelar (LOO:LOP::7:3) em cômoro fracamente elevado. Genas estreitas, correspondendo à metade do perfil dos olhos, quasi paralelas a êles, somente mais estreitadas no quinto inferior; puncturação esparsa, pouco menos grossa que a da fronte. Clípeo quasi plano, ápice arredondado, esparsamente puncturado, as puncturas menores e um pouco mais rasas que as da fronte; no têrço inferior alguns pêlos grandes, amarelados, bastante esparsos; toda a superfície recoberta por fina, densa e lustrosa pilosidade argêntea e recumbente. Olhos bem desenvolvidos, afastados ao nível do ocelo anterior cerca de 1/5 mais do que ao nível do clípeo; providos de pilosidades curtíssima, muito esparsa, somente visivel por meio de grande aumento; sinus ocular em ângulo mais agudo. Mandíbulas de comprimento equivalente aos segmentos III-V da antenas; largura da base mais ou menos 1/3 do comprimento; a extremidade, a partir do II dente, recurvada; superfície brilhante, lisa, com pêlos dispersos, relativamente fortes, originados de puncturas; quatro dentes externos, o basal mais largo, direito, de ponta romba, o apical agudo e recurvo, os dois intermediários menores; dente basal interno, forte, trianguliforme. Antenas: escapo de comprimento igual ao do pedicelo e mais os III e V segmentos reunidos, distalmente engrossado, côndilo fortemente recurvo, a base aproximadamente duas vêzes mais larga que o ápice; pedicelo com os 2/3 apicais alargados, semiarredondados, aproximadamente da metade do III; flagelo suavemente engrossado até o penúltimo segmento; III segmento de lados quase paralelos; IV-IX de comprimentos iguais e larguras crescentes; X e XI de comprimentos iguais e larguras crescentes; largura do XII quase o dobro do comprimento; XIII de comprimento igual aos dois antecedentes reunidos, os 3/5 de seu comprimento estreitam-se gradativamente, terminando o segmento em ponta romba; sua linha inferior quase direita, e a superior convexa.

Protórax com a entumescência junto ao ângulo súpero-posterior pouco mais saliente que a da fêmea; margem posterior fracamente sinuada, em ângulo mais aberto; puncturação esparsa, mais adensada nos ângulos posteriores, mais fraca que a das mesopleuras. Mesonoto fortemente abaúlado, mais largo que longo, fortemente estreitado para a frente, com puncturação esparsa, coberto de curtíssima pilosidade recumbente. Mesopleuras fortemente abaúladas, fortemente puncturadas. Tégulas abaúladas no meio, em declive para a frente e planas posteriormente, alongadas e coriáceas. Escutelo quadrangular, pouco mais largo que comprido; larga depressão central ao meio da qual se levanta pequena carena longitudinal; puncturação esparsa, puncturas pouco mais profundas que as do mesonoto; axilas pequenas, com margem cortante e declive perpendicular com a puncturação quase nula. Postescutelo largamente deprimido no meio; puncturação forte e densa aos lados e muito esparsa sôbre o sulco existente ao fundo. Própodeo pouco convexo, com estriação dorso-lateral, esparsamente puncturado, a depressão mediana pouco pronunciada.

Pecíolo abdominal do comprimento da tíbia posterior e ligeiramente menor que o propódeo somado ao escutelo e ao postescutelo; visto de perfil a metade basal mostra-se paralela e direita ao passo que a metade apical é engrossada e encurvada para cima e quase duas vêzes mais grossa que a basal; último esternito com estreita depressão transversal no meio e com a metade apical em larga depressão circular densamente revestida de pêlos amarelados. Genitália representada na figura E, est. 14.

Coloração: do mesmo padrão que a da fêmea, porem mais clara; ocorrem ainda maculações amarelas nas seguintes zonas: lado inferior do escapo; face externa das coxas; tíbias anteriores quase totalmente; estreita faixa alongada, descendente junto à sutura mesopleural; bordo anterior do postescutelo. As maculações amarelas dos machos são mais patentes e melhor desenvolvidas que as das fêmeas e tambem são objeto de extensa variação.

Comprimento (cabeça + tórax + tergitos I e II): 7,5 — 8 mm; asa anterior 6,5 mm.

Material examinado: Numerosos espécimens de ambos os sexos, procedentes de: Itatiaia, Estado do Rio de Janeiro, 700 m, R. L. ARAUJO coll.: Araçatuba, Est. de São Paulo, E. VAROLI coll. Examinei ainda um ninho em Vespasiano, Est. de Minas Gerais.

Distribuição geográfica: México (Oaxaca, Cordoba, Vera Cruz, Tierra Colorada, Guerrero); Panamá (Ilha de Barro Colorado); Colômbia (Popayan); Venezuela; Trinidad; Guiana Ingleza (Kartabo; Bartica); G. Holandeza; G. Franceza (Caiena); Perú (La Merced, Valle de Chanchamayo; Yanango; Satipo; Tingo Maria; Oxapampa); Brasil (Amazônia: Belem; Macapá; Óbidos; Barcelos; Baixo Içá; Baixo Javarí; Anauerapuçú. Ceará: Maranguape, Serra de Baturité. Goiaz: Santa Rita das Antas. Mato Grosso: Cuiabá. Minas Gerais: Vespasiano. Espírito Santo. Rio de Janeiro: Itatiaia. São Paulo: Araçatuba); Paraguay (Puerto Bertoni); Argentina (Cordoba). Não se achavam citadas na literatura somente as seguintes localidades: Vespasiano, Itatiaia e Araçatuba.

Ninho (Estampa 14, fig. *F*): O ninho desta espécie foi descrito e figurado pela primeira vez por MOEBIUS (1856). IHERING (1904), DUCKE (1904, '05, '05a e 1910) e BERTONI (1911 e 1918) referem-se às construções de *M. cingulata* com breves descrições ou apenas com referências ao aspecto e localização, havendo porem DUCKE (1905) incluido o sistema de nidificação entre os caracteres diferenciais do gênero. Recentemente P. RAU (1933) estudou longamente os ninhos desta espécie, por êle observados na ilha de Barro Colorado, Panamá, descrevendo-os minuciosamente e apresentando boas ilustrações. A êste excelente observador deve-se a primeira referência ao fato curioso destas vespas incluirem no material com que fabricam a

"coberta" do ninho, uma substância vítrea, transparente, de natureza ainda não bem definida, que dá a impressão de pequeninas "janelas" dispostas como que "intencionalmente". Refere-se ainda P. G. HOWES (Nat. Hist., 1933, 33:100) a tal tipo de ninhos, da mesma procedência, mencionando tambem êsse detalhe da sua construção.

O ninho é do tipo fragmocítaro imperfeito, constando fundamentalmente de um favo colocado sôbre um suporte e protegido por uma fina cobertura de "papel", com o orifício de vôo em um dos lados. O favo apoia-se em suportes de natureza diversa: rochas, cascas de árvores, madeiramento de construção, folhas de palmeiras e mesmo paredes. O colorido geral da "coberta", largamente variavel, é, nos exemplares que pudemos examinar, de um cinzento escuro; confunde-se com o aspecto do suporte onde se acha assestado. É irregularmente ruguloso, de forma variavel, alongado ou arredondado, de contôrno irregular, com as paredes verticais pouco elevadas. Em certas circunstâncias a vista desprevenida dificilmente o distingue. O favo é, na mór parte das vêzes, completamente isolado da cobertura tanto na parte superior com dos lados, havendo espaço suficiente para a acomodação do enxame. Examinada contra a luz, a "cobertura" do ninho mostra inúmeros pontos transparentes, de forma e tamanho mui variados, constituidos pela substância transparente acima referida e que lhe empresta aspecto característico. As medidas tomadas nos exemplares que examinamos, são as seguintes: comprimento 11,5-12 cm; largura 8 cm; altura 9 mm; diâmetro das células 3 mm. MOEBIUS dá as seguintes medidas: 195 mm × 40-65 e 8-15 de altura. As células são fechadas por meio de finíssima membrana de seda colocada ligeiramente abaixo da margem. BERTONI (1911) regista a obtenção de um himenóptero calcidídeo, não determinado, que se criara em ninho de *M. cingulata*, e RAU (1933) faz notar que esta espécie armazena certa quantidade de mel em seus favos.

Metapolybia suffusa (FOX, 1898)

Figs. 1-3 e estampa 13, fig. *D*

Polybia suffusa FOX, 1898, Proc. Acad. Nat. Sci. Philad., 3: 455; IHERING, R., 1904, Rev. Mus. Paul., 6: 169, 185.

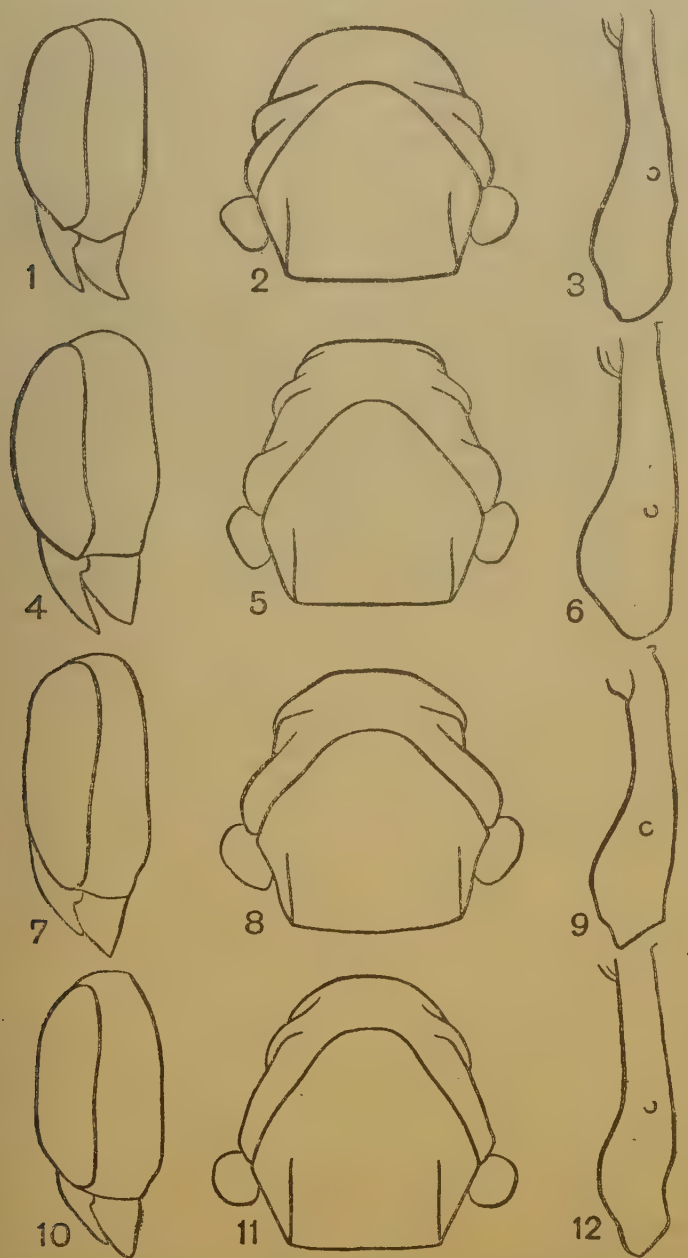
Metapolybia pediculata, DUCKE, A., 1905, Rev. d'Ent., Caen, 24: 17; idem, 1905, Bol. Mus. Pará, 4 (4): 671; idem, 1910, Ann. Mus. Nat. Hung., 8: 488; idem, 1918, Rev. Mus. Paul., 10: 331 (separata, p. 19).

Metapolybia suffusa, WEYRAUCH, W., 1943, Bol. Mus. Hist. Nat. "Javier Prado", 7 (24/25): 76; BEQUAERT, J., 1944, Bull. Mus. Comp. Zool., 94 (7): 276.

Metapolybia pediculata rufopicta DUCKE, 1910, Ann. Mus. Nat. Hung., 8: 488; BEQUAERT, J., 1944, Bull. Mus. Comp. Zool., 94 (7): 276 (sinonímia).

Redescrição:

♀ — Cabeça fracamente puncturada, alguma puncturação rasa pouco patente perto do sinus ocular; fronte e vértice ásperos, revestidos de curtíssima pilosidade argêntea, pouco brilhante. Clípeo mais largo que alto; suturas látero-superiores atingindo a fosseta sub-antenal em linha reta; sutura sub-antenal pra-



Figs. 1-3 — *Metapolybia suffusa* (Fox, 1898) ♀, fig. 1 — cabeça de perfil, fig. 2 — pro- e metanoto, fig. 3 — pecíolo. Figs. 4-6 — *M. unilineata* (Ihering, 1904) ♀, cabeça de perfil, pro- e metanoto, pecíolo. Figs. 7-9 — *M. azteca*, n. sp. ♀, cabeça de perfil, pro- e metanoto, pecíolo. Figs. 10-12 — *M. bromelicola*, n. esp. ♀, cabeça de perfil, pro- e metanoto, pecíolo.

ticamente ausente. Olhos pouco mais afastados no vértice que ao nível do clípeo. Genas da largura do perfil dos olhos; ângulos superiores um tanto salientes; puncturação muito rasa e esparsa.

Protórax com puncturação muito rasa esparsa, pouco conspícua; crista saliente não cortante; ângulos umerais muito ligeiramente entumescidos; margem posterior fracamente sinuada, ao centro em semicirculo. Menosoto sem puncturação aparente; tão longo quanto largo. Mesopleuras abaúladas, com puncturação rasa e esparsa, porem mais conspícua que a das outras regiões; sutura mesopleural fraca. Escutelo com escassa puncturação sôbre a zona horizontal. Postescutelo com a depressão mediana muito pouco pronunciada e ângulos látero-superiores pouco entumescidos. Propódeo com sulco longitudinal nítido, pouco profundo e as zonas laterais pouco abaúladas; puncturação dorsal rasa, esparsa, um pouco mais patente aos lados; não ha traços de estriação transversal. Nervuras TrCub I e II mais afastadas na R, de maneira a tornar a II célula cubital, no alto, mais alargada que no genótipo.

Pecíolo com as expansões espiraculares aproximadamente equidistantes de ambas as extremidades; metade proximal ca. um terço da largura do ápice; dilatação apical pouco pronunciada, lados apenas ligeiramente côncavos depois dos tubérculos; visto de perfil, engrossado gradativamente, sem subida abrupta; puncturação densa na margem dos demais segmentos abdominais.

Coloração: no material examinado o colorido fundamental da cabeça e do tórax é castanho quase negro, principalmente na fronte e no mesonoto; o do abdomen castanho-avermelhado. Antenas, patas, tégulas e nervulação alar castanho-avermelhados. Ha as seguintes maculações amarelas: maior parte do clípeo; ângulos inferiores das órbitas internas; mancha basal nas mandíbulas; zona inferior das genas; lado inferior do escapo; coxas anteriores; bordos do protórax e seu ângulo inferior; mancha nas tégulas; mancha ao longo da sutura mesopleural; maior parte dos escutelos; grandes manchas aos lados do sulco propodeal e extremidades do propódeo; margem do pecíolo, a mancha alongando-se lateralmente; bordos dos segmentos abdominais.

Comprimento (cabeça + tórax + tergitos I e II): 8 mm; asa anterior 7mm.

♂ — Cabeça revestida de pilosidade argêntea, lustrosa, aveludada. Fronte com puncturação rasa, esparsa, patente. Clípeo mais plano, de ápice arredondado; suturas súpero-laterais curvas; suturas sub-antenais maiores; densamente revestido da mesma pilosidade da fronte, impuncturado. Genas ca. de dois terços da largura dos olhos em perfil; puncturação muito esparsa e rasa; ângulos superiores arredondados, não salientes.

Tórax aveludado, lustroso, excepto quanto aos escutelos. Protórax com puncturação fraca, escassa; crista patente, não cortante; ângulos umerais apenas entumescidos. Mesonoto sem puncturação visivel. Mesopleras menos abaúladas, com puncturação escassa. Escutelo com fraca carena mediana. Postescutelo com a depressão central e com a puncturação quasi imperceptíveis. Propódeo com o sulco mais largo e mais profundo; puncturação pouco mais forte e conspícua que a da mesopleura.

Abdomen com puncturação conspícua nas margens dos segmentos; último esternito com a metade distal plana.

Coloração: Cabeça e tórax de colorido geral mais escuro que o da fêmea; maior extensão do amarelo do clípeo, mandíbulas e coxas anteriores; manchas do propódeo bastante reduzidas; último segmento abdominal não maculado.

Além das maculações descritas para a fêmea, ha no macho mais as seguintes: coxas medianas e posteriores; face externa das tíbias anteriores e em menor extensão a das medianas.

Comprimento (cabeça + tórax + tergitos I e II): 9 mm; asa anterior 7 mm.

Das espécies sem estriação propodeal distingue-se principalmente *suffusa*: de *bromelicola* pela puncturação geral muito mais fraca, menor profundidade e nitidez do sulco propodeal e pela coloração geral; de *azteca* pelo maior alongamento geral do corpo, prática ausência de puncturação da fronte e coloração geral.

Material examinado: 3 ♀♀ e 1 ♂; Colômbia (Muzo, Depart. de Boyacá; alt. 900 m). Material colecionado e legado pelo Dr. J. BEQUAERT, a quem expresso aqui os meus agradecimentos.

Distribuição geográfica: Perú; Bolivia (Restrepo, Int. Meta; Muzo, Depto. de Boyacá); Brasil (Corumbá, Est. de Mato Grosso). Segundo DUCKE (1910) esta espécie ocorreria tambem no México: "...cette dernière forme (*suffusa* FOX) se trouve surtout dans les contrées éloignées de l'équateur (Mexique, Brésil central)..."

Ninho: Na literatura, a única referência ao ninho de *M. suffusa*, que pudemos encontrar, é de BEQUAERT (1944): "...I found *M. suffusa* and *cingulata* nesting side, by side, but in distinct colonies". Deduzimos desta informação serem os ninhos de ambas as espécies, do mesmo tipo.

Metapolybia unilineata (IHERING, 1904)

Figs. 4-6

Polybia pediculata unilineata IHERING, R., 1904, Rev. Mus. Paul., 4: 184-5.
Metapolybia pediculata unilineata, DUCKE, A., 1910, Ann. Mus. Nat. Hung., 8: 488.
Metapolybia cingulata, BEQUAERT, J., 1944, Bull. Mus. Comp. Zool., 94 (7): 277 *(partin)*.

Redescrição:

♀ — Cabeça sem o revestimento de pilosidade sedosa. Genas mais estreitas que os olhos, ao centro paralelas, terços inferior e superior convergentes, ângulo superior fraco; a puncturação esparsa e diminuta, muito mais fraca que a da fronte. Fronte com puncturação forte, escasseando para o vértice; esta é a zona de puncturação mais forte e densa desta espécie; nenhuma outra parte do corpo se lhe compara, embora a da mesopleura tambem seja densa. Clípeo com puncturação muito mais fraca que a da fronte, a diferença muito mais acentuada que aquela verificada no genótipo. Mandíbulas com a convexidade distal pouco mais pronunciada.

Protórax com crista forte, cortante, terminando bem antes da margem posterior; puncturação muito fina e pouco nítida. um tanto mais adensada nos ângulos posteriores; ângulos umerais salientes, saliência bem patente, arredondada atrás e quasi reta na frente, visto o inseto de cima. Mesonoto fracamente lustroso; puncturação rasa, fraca, esparsa, comparável à do pronoto. Meso-

pleuras densamente puncturadas, as puncturas porem muito rasas, menos grosseiras que a da fronte, mais adensadas junto à sutura mesopleural. Escutelo menos densamente puncturado que a mesopleura, as puncturas porem comparáveis às daquela região, Postescutelo de ângulos látero-superiores salientes e com puncturação mais densa que a do escutelo; depressão central praticamente impuncturada. Propódeo nitidamente sulcado em quase toda a sua extensão; sulco alargado para baixo; dorso-lateralmente estriado, estrias finas, mas numerosas e nítidas; puncturação adensada junto aos ângulos superiores e rarefeita em todo o resto do propódeo, principalmente nas partes laterais.

Pecíolo mais curto, constrição post-espiracular menos profunda e a zona seguinte mais arredondada, não expandida apicalmente; visto de perfil é mais abruptamente levantado para a dilatação post-espiracular.

Coloração: Negra, excepto as antenas, patas, mandíbulas e nervulação alar que são acastanhadas ou ferruginosas. Ha tambem as seguintes maculações amarelas; estreita faixa apical no pecíolo e outras faixas muito estreitas nos esternitos do pecíolo e do II segmento, a dêste último sem atingir os lados. Num dos exemplares aparece tambem pequena mancha ao fundo das órbitas internas e noutro ha estreita faixa no bordo inferior do clípeo

Comprimento (cabeça + tórax + tergitos I e II): 8,5 mm; asa anterior 6,5 mm.

♂ — Fronte mais esparsamente puncturada; opaca, excepto nas órbitas internas, sinus ocular em ângulo mais agudo. Clípeo mais estreito, com puncturação muito esparsa; brilho sedoso, argênteo. Mandíbulas bem mais robustas, convexidade externa bastante pronunciada. Olhos providos de pilosidade curtíssima. Genas aproximadamente da metade da largura dos olhos; em declive; coriáceas, destituidas de puncturação; ângulo superior não saliente, bem arredondado.

Pronoto com a puncturação esparsa, quase imperceptivel; ângulos umerais menos salientes, mais arredondados. Mesonoto pouco mais abaúlado, pouco mais largo que longo; puncturação rasa, esparsa, pouco mais patente que a do pronoto. Postescutelo com a depressão central mais rasa e os ângulos súpero-laterais menos entumescidos. Propódeo com o sulco mediano mais largo.

Coloração: Negro; mandíbulas, patas e antenas, ferruginosas. Maculações amarelas assim distribuidas: bordo distal do clípeo; ângulos inferiores das órbitas internas; face interna basal, do escapo; face interna das coxas anteriores; face externa lateral das tíbias anteriores; orla do pecíolo; orla dos esternitos II-IV.

Comprimento (cabeça + tórax + tergitos I e II): 7,5 mm; asa anterior 6,5 mm.

Distingue-se esta espécie de *cingulata* pelo maior entumescimento dos ângulos umerais do pronoto, pela maior profundidade e nitidês do sulco propodeal e pelo maior alargamento do ângulo central da margem posterior do pronoto.

Material examinado: 4 ♀♀ e 1 ♂; Rio Juruá, Estado do Amazonas; da coleção do Departamento de Zoologia de São Paulo (Tipos!).

Distribuição geográfica: A única localidade citada na literatura é a de onde procedem os exemplares típicos acima referidos.

A curta diagnose que GRIBODO apresenta para a sua *Tatua decorata* GRIB., 1898, adapta-se à *M. unilineata* e faz suspeitar referir-se a esta espécie. Não podemos resolver esta dúvida, cujo esclarecimento somente seria possivel, a nosso vêr, por meio do exame dos exemplares utilizados por GRIBODO.

Metapolybia azteca, n. sp.

Figs. 7-9

♀ — Fronte áspera, puncturação bem patente até quase o nível das antenas; daí para baixo as puncturas são praticamente imperceptíveis; toda fronte revestida de curta pilosidade argêntea, sem brilho especial. Clípeo muito rasa e esparsamente puncturado, fazendo o seu aspecto, neste particular, contraste com o da fronte. Genas quasi da largura dos olhos, estreitando-se para o alto, sem formar ângulo saliente; puncturação rasa e esparsa.

Protórax com a crista romba, baixa; puncturação mais fraca que a da mesopleura; ângulos umerais mui ligeiramente entumescidos; margem posterior pouco sinuada, o ângulo central largo, arredondado. Mesonoto tão longo quanto largo; fracamente aveludado; puncturação rasa, porem nítida, mais dispersa e mais fraca que a da fronte. Mesopleuras com puncturação mais nítida e um pouco menos aglomerada que a da fronte. Escutelo com depressão distal apenas perceptivel; puncturação nítida, mais grossa que a do mesonoto, ligeiramente adensada para os lados; impressão mediana fina, longitudinal. Postescutelo com os ângulos látero-superiores pouco entumescidos e a puncturação semelhante à do escutelo, porem mais esparsa. Propódeo sem indicações perceptíveis de estriação dorso-lateral; sulco propodeal estreito, pouco profundo, bem delimitado, alargado para baixo; puncturação lateral semelhante à da mesopleura, porem bem mais esparsa; pilosidade clara bem patente, principalmente densa nas zonas posteriores; numerosas cerdas erectas, amareladas.

Pecíolo com os tubérculos espiraculares mui pouco salientes e com a zona seguinte de lados paralelos; II segmento com finíssima puncturação junto à margem posterior e os demais com puncturação mais forte e densa.

Coloração: Negra; escapo, pedicelo, mandíbulas, tégulas, nervulação alar e patas, ferruginosas. Maculações amarelas assim distribuidas: face inferior do escapo; larga faixa marginal no clípeo; mancha alongada ocupando metade da distância do sinus ocular até o clípeo; manchinha arredondada no extremo das genas; extremidade da face interna das coxas anteriores; ângulo inferior do protórax, toda a crista e a margem posterior; mancha alongada junto à sutura mesopleural; placa umeral; larga faixa na zona superior do postescutelo, estreitada no meio; manchas oblongas, inferiormente junto ao sulco propodeal; expansões e "dentes" apicais do propódeo; manchinhas alongadas, às vêzes reunidas, atrás da inserção peciolar do elevador do abdomen; faixa apical prolongada lateralmente no pecíolo; orlas dos segmentos abdominais II-V. Estas maculações amarelas variam e no abdomen podem ser restrictas ao I segmento e somente aos esternitos II-IV.

Comprimento (cabeça + tórax + tergitos I e II): 8 mm; asa anterior 7 mm.

Das espécies sem estriação propodeal distingue-se principalmente *azteca:* de *suffusa* pelos caracteres já mencionados na descrição desta espécie; de *bromelicola* pela menor densidade e profundidade da puncturação geral, pela menor largura das genas com relação aos olhos, e pela maior grossura da expansão peciolar post-espiracular.

Material examinado: 3 ♀♀, da coleção do Departamento de Zoologia de São Paulo; duas com o seguinte rótulo: "Museum Paris, Basse-Mistèque, État d'Oaxaca, Rio Mariscala, L. DIGUET, 1903" (Det. por R. DU BUYSSON como *M. pediculata* SAUSS.); a outra rotulada simplesmente: Oaxaca, México.

Holótipo e parátipos: No Depart. de Zoologia de São Paulo.

Metapolybia bromelicola, n. sp.

Figs. 10-12; estampa 13, fig. *B* e est. 14, fig. *G*

♀ — Cabeça opaca, revestida de curtíssima pilosidade cinérea, opaca, excepto o ângulo central distal do clipeo que é glabro e brilhante. Fronte áspera, densamente puncturada, as puncturas nítidas, algumas confluentes. Clípeo de superfície coriácea, pilosidade mais densa; bem menos densamente puncturada que a fronte, as puncturas mais rasas; suturas látero-superiores atingindo a fosseta sub-antenal em linha reta; suturas sub-antenais praticamente ausentes. Genas ligeiramente mais largas que os olhos, de perfil; puncturação esparsa, comparável à do clípeo; ângulos superiores mui pouco salientes. arredondados.

Tórax revestido de fraca pilosidade cinérea, mais densa sôbre o propódeo. Protórax com puncturação tão densa quanto a do mesonoto, as puncturas porem mais nítidas; ângulo central não acuminante, largamente circular; crista saliente, de largura uniforme, não cortante; entumescência dos ângulos umerais apenas levemente indicadas. Mesonoto pouco menos longo que largo, não aveludado; densamente puncturado, as puncturas mais rasas porem um pouco mais adensadas que as das mesopleuras. Mesopleuras com puncturação forte, regular. Escutelo com puncturação mais grossa e mais esparsa que a das mesopleuras. Postescutelo de ângulos látero-superiores muito pouco salientes; depressão central apenas indicada; puncturação mais esparsa que a do escutelo. Propódeo com sulco central distinto, profundo, de largura praticamente uniforme; puncturação mais grossa e pouco menos densa que a das mesopleuras. Célula CubII mais alargada ao ápice; nervura TrCubIII mais tortuosa tornando mais longa a célula CubIII inferiormente.

Pecíolo com os tubérculos espiraculares pouco salientes e colocados logo depois do meio; dilatação post-espiracular fraca, no ápice com os lados paralelos; visto de perfil o pecíolo, na porção post-espiracular, sobe muito suavemente para formar a dilatação apical, descendo depois em linha mais abrupta. Demais segmentos com puncturação densa na metade posterior, as puncturas pequenas, rasas.

Coloração: Côr fundamental negra, com tons ferruginosos no tórax e abdomen. Antenas, mandíbulas, tégulas, nervulação alar e patas, acastanhadas. Maculações amarelas aparecem nas seguintes zonas: margem apical do clípeo; ângulos inferiores das órbitas internas; ângulo inferior, crista e margem posterior

do protórax; margem posterior da bolsa escutelar; ângulos súpero-laterais do escutelo; margem superior do postescutelo; pequenas manchas junto aos "dentes" do propódeo e expansões apicais dêste; margem dos segmentos I-V.

Comprimento (cabeça + tórax + tergitos I e II): 7,5—8 mm; asa anterior 6,5 mm.

♂ — Cabeça revestida de densa pilosidade argêntea, curtíssima, mais basta sôbre o clípeo. Olhos mais aproximados ao nível do clípeo. Clípeo de ápice arredondado; pouco mais alto e com a puncturação pouco mais grossa. Mandíbulas mais convexas na metade distal. Genas muito estreitas, menos da metade da largura dos olhos; em declive; ângulos superiores bem arredondados. Propódeo com sulco mediano mais arredondado; sem estriação transversal.

Pedicelo mais curto; os espiráculos no meio.

Coloração: semelhante à da fêmea; maior largura da faixa amarela apical do clípeo; face externa das coxas anteriores e em menor extensão a das medianas; as maculações apicais dos segmentos do abdomen são apenas indicadas.

Comprimento (cabeça + tórax + tergitos I e II): 7,5—8 mm; asa anterior 6,5 mm.

Para comparação desta espécie com as que não apresentam estriação propodeal vejam-se os comentarios em *suffusa* e *azteca*.

Material examinado: Numerosos indivíduos de ambos os sexos: Itatiaia, Est. do Rio de Janeiro; alt. 700 m; J. F. ZIKÁN coll. et leg.

Holótipo e alótipo: Coleção do Instituto Biológico de São Paulo; parátipos no Departamento de Zoologia de São Paulo e na coleção Zikán.

Ninho (Estampa 14, fig. *G*): O ninho desta espécie é altamente interessante porque em sua construção as vespas, conservando o característico fundamental típico: favo assentado largamente sôbre suporte, dispensaram a proteção da cobertura externa descrita para o ninho de *M. cingulata*. Os favos são assentados na superfície interna de folhas de uma bromoliácea terrestre, no recesso formado pela superposição parcial das folhas. No exemplar que estudamos, retiradas as folhas mais externas, e aparadas as longas extemidades das mais internas, descobriram-se 4 favos alongados, de tamanhos diferentes, um em cada folha, medindo o maior dêles 9 cm de comprimento por 3,5 cm de largura máxima; as células medem 3 mm de diâmetro por ca. 10 de profundidade. Os ninhos de *M. cingulata* são defendidos pela sua semelhança externa com a superfície onde estão construidos; os de *M. bromelicola* são protegidos pela sua situação no fundo da planta e pelos acúleos abundantes das margens das folhas.

Deve-se a descoberta desta espécie ao meu prezado amigo snr. J. F. ZIKÁN, conhecido entomologista, que observou duas colônias dessa vespa e a quem expresso aqui os meus agradecimentos pelo material e observações que me proporcionou.

CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF THE GENUS "METAPOLYBIA DUCKE, 1905" (HYM. VESPIDAE)

Abstract

In this paper the genotype of Metapolybia Ducke, 1905, M. cingulata (Fabr., 1804) is studied; M. unilineata (Ihering, 1904) is raised to specific rank; M. suffusa (Fox, 1898) is redescribed. Two new species, M. azteca from Mexico and M. bromelicola from this country (Itatiaia, State of Rio de Janeiro), are described.

The nest of M. bromelicola is also described for the first time. Instead of building a single comb covered with a sheet of paper on the surface of a support, the insect places several combs on the inner surface of leaves of a bromeliaceous plant. No covering is made, but the nest is well hidden by the plant and in some way protected by the numerous thorns on the edge of its leaves.

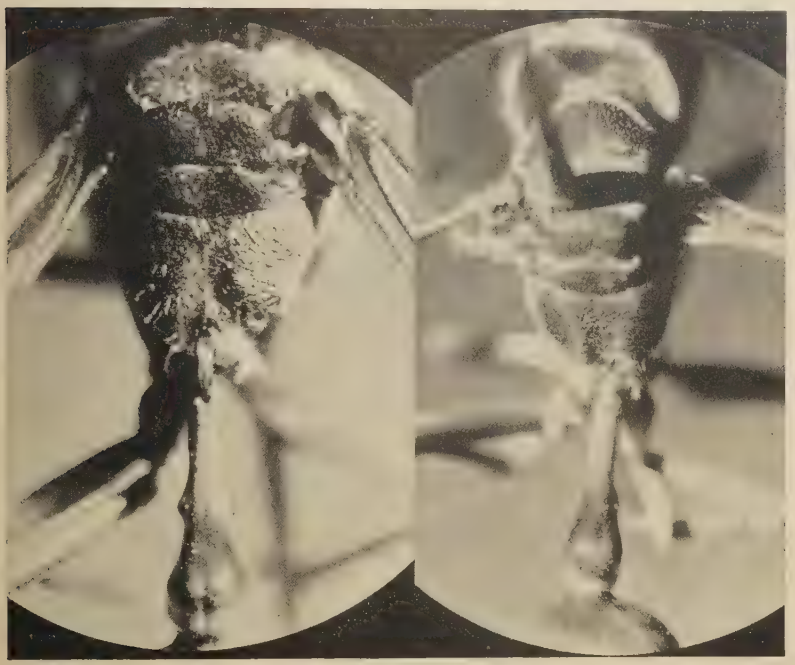
EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 13

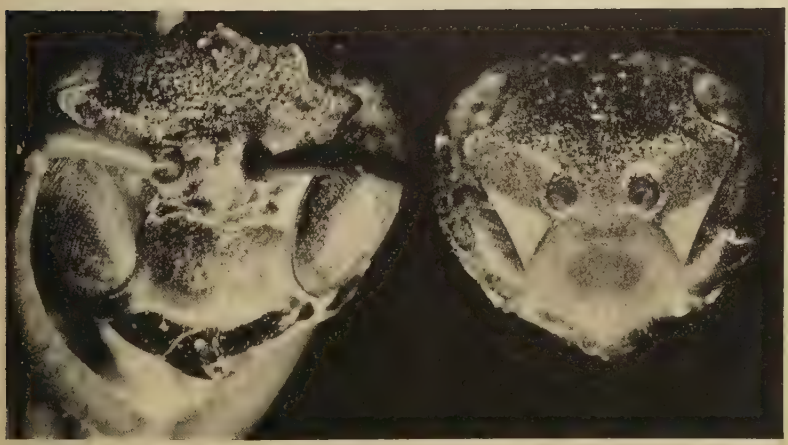
Fig. *A* — Propódeo e pecíolo de *Metapolybia cingulata* FABR., ♀
Fig. *B* — Propódeo e pecíolo de *Metapolybia bromelicola*, n. sp. ♀
Fig. *C* — Cabeça de *M. cingulata* FABR., ♀
Fig. *D* — Cabeça de *M. suffusa* (FOX) ♀

Estampa 14

Fig. *E* — Genitalia de *Metapolybia cingulata* FABR., ♂
Fig. *F* — Ninho e um favo de *M. cingulata* FABR.
Fig. *G* — Ninho de *Metapolybia bromelicola*, n. sp.



A *B*



C *D*

F
E
G

Vol. 16 — Art. 8 Novembro de 1945

SÔBRE A QUIMIOTERAPIA DA TOXOPLASMOSE

POR

E. Biocca e P. Nobrega

Do Lab. Paulista de Biologia e do Instituto Biologico de S. Paulo

INTRODUÇÃO

Em 1941 SABIN *e* WARREN (6) referem observação interessante sôbre a ação de algumas sulfamidas na prevenção da toxoplasmose, com resultados terapêuticos, todavia, completamente negativos. Em junho de 1942, BIOCCA e PASQUALIN (1) demonstram pela primeira vez a ação terapêutica da sulfapiridina e sulfatiazol, administrados em suspensão oleosa, na toxoplasmose experimental. Nestas experiências o sulfatiazol se mostra ligeiramente superior à sulfapiridina. Em outubro de 1942, SABIN e WARREN (7) obtêm sucesso parcial com as sulfas, administradas "per os" no tratamento da toxoplasmose. Em 1944, WEINMAN e BERNE (8) referem bons resultados com o emprêgo da sulfapiridina no tratamento da toxoplasmose humana. Êste trabalho confirma as observações anteriores de BIOCCA e PASQUALIN (1).

Em prosseguimento aos seus trabalhos sôbre o tratamento quimioterápico da toxoplasmose, BIOCCA (2,3) estuda a ação de diversas sulfonas, a maioria das quais sintetizadas por MINGOJA (4) e MINGOJA e BERTI (5), no tratamento da toxoplasmose experimental de coelhos, camondongos e pombos, chegando à conclusão de que os derivados da nitro-amino e diamino difenilsulfona exercem forte ação terapêutica na toxoplasmose dos animais, tornando assim pràticamente possível, o tratamento da toxoplasmose humana. Das sulfonas sintetizadas por MINGOJA e BERTI (5) na série das nitro-amino difenilsulfonas, o produto mais ativo é o formil derivado, que foi chamado de 117 M; na série diamino difenilsulfona, o mais ativo é o diforildiamidifenilsulfona, que foi chamado de formilone.

Em 1943, BIOCCA e GRIECO (trabalho não publicado) obtêm completo sucesso no tratamento dum caso humano de toxoplasmose, com reação sorológica positiva, administrando intramuscularmente suspensões oleosas de produto 117 M (4 nitro-4'-formilamino-difenilsulfona).

No presente trabalho procuramos confirmar os resultados anteriores de BIOCCA e estudar a ação de outros produtos como a sulfadiazina, diasone e diclorone no tratamento da toxoplasmose experimental de camondongos e pombos.

MATERIAL E MÉTODOS

Como material infetante empregamos uma amostra de toxoplasma isolada por um de nós (NOBREGA) de coelhos, dotada de grande patogenicidade não só para êstes animais como também para pombos, camondongos e pintos.

Como animais de experiências, utilizamos camondongos e pombos. Em 5.6.45, 70 camondongos são inoculados no peritônio com 0,2 cm³ da suspensão, em água fisiológica, do triturado de fígado e baço de pombo infetado com toxoplasma. No terceiro dia da infecção, 10 camondongos são conservados como testemunhas e os 60 restantes são divididos em grupos de 10 e tratados com as seguintes drogas, em suspensão a 2,5%, em óleo de amendoim: sulfatiazol, sulfadiazina, diasone, diclorone, 117 M e formilone. Cada camondongo é inoculado subcutâneamente com 0,5 cm³ da suspensão, ou sejam 0,012 gr, o que corresponde aproximadamente a 0,5 gr por quilo de peso vivo.

Na mesma data, isto é, em 5.6.45, 60 pombos são infetados com toxoplasma por inoculação intramuscular; 10 animais são conservados como testemunhas e os 50 restantes recebem, a partir do 6.º dia de infecção e durante 3 dias consecutivos, a injeção subcutânea de 5 cm³ da solução a 2,5% das drogas referidas, exceção do sulfatiazol.

RESULTADOS

Os resultados da experiência estão resumidos nas tabelas 1 e 2.

TABELA 1

Tratamento de camondongos infetados com toxoplasma

Droga usada	N.º de camondongos	Sobrevivência em dias										% de mortalidade
Sulfatiazol	10	10	9	11	12	18	19 (x)	25	S	S	S	70
Sulfadiazina . . .	10	9	18 (x)	25 (x)	S	S	S	S	S	S	S	30
Diasone	10	7	8	8	9	9	10	11	12	12	12	100
Diclorone	10	7	12	24	S	S	S	S	S	S	S	30
117 M	10	19 (x)	26	27 (x)	S	S	S	S	S	S	S	30
Formilone	10	7	24	S	S	S	S	S	S	S	S	20
Testemunhas não tratadas	10	6	6	6	7	7	7	7	8	8	8	100

(*) Em todos os animais mortos, com exceção dos assinalados (x), foi encontrado toxoplasma no esfregaço do fígado ou baço.
S = sobrevive indefinidamente.

TABELA 2

Tratamento de pombos infetados com toxoplasma

Droga usada	N.º de pombos	Sobrevivência em dias										% de mortalidade
Sulfadiazina . . .	10	21 (x)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	10
Diasone	10	9	9	9	9	10	10	12	17	24	24	100
Diclorone	10	10	8	9	12	14	15	S	S	S	S	60
117 M	10	9	12	15	16	19	21	S	S	S	S	60
Formilone	10	9	9	10	10	15 (x)	S	S	S	S	S	50
Testemunhas não tratadas	10	9	9	9	9	10	10	11	12	12	14	100

(*) Em todos os animais mortos, com exceção dos assinalados (x), foi encontrado toxoplasma no esfregaço do fígado ou baço.
S = sobrevive indefinidamente.

Os resultados da tabela 1 não só confirmam as observações de BIOCCA (2,3) sôbre a grande eficiência terapêutica do 117 M e formilone no tratamento da toxoplasmose experimental, como também demonstram o grande e pràticamente igual valor curativo da sulfadiazina e diclorone; nos camondongos tratados por êstes dois últimos medicamentos a mortalidade foi de 30%, em comparação com 70% e 100% entre os animais tratados respectivamente pelo sulfatiazol e diasone. Êste último produto é destituido, portanto, de qualquer valor terapêutico na toxoplasmose.

A análise da tabela 2 demonstra que a experiência feita em pombos confirma os dados anteriores, embora os resultados não sejam tão brilhantes. Convém, entretanto, ressaltar a grande atividade da sulfadiazina, que curou 90% dos animais tratados; o único pombo morto, além de não apresentar toxoplasmas nos esfregaços do fígado e baço, teve uma sobrevivência relativamente longa.

TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE E IMUNIDADE

Todos os pombos e camondongos sobreviventes são reinoculados com toxoplasma em 6.6.45, isto é, trinta dias após a primeira inoculação. Todos os animais, sem exceção, resistem perfeitamente sem mostrar sinais de doença, ao passo que morrem todos os controles. Êste resultado parece indicar que a administração duma dose pequena de medicamento, suficiente todavia para evitar a morte, confere ao organismo a possibilidade de estabelecer um mecanismo de resistência contra a

reinfecção pelo toxoplasma. Se a formação desta resistência é condicionada pela dosagem do medicamento ou fenômenos de premunição, é assunto que será objeto de trabalho ulterior.

ON THE THERAPEUTIC EFFECT OF SULFONAMIDE COMPOUNDS AGAINST TOXOPLASMA INFECTION

Abstract

Recent work by Biocca (2,3) with several sulfonamide compounds, most of which were synthetized by Mingoja (4) and Mingoja and Berti (5), led to the conclusion that some of these compounds, especially nitro-amino and diamino-di-phenyl-sulfone, possess a marked therapeutic action against animal toxoplasmosis.

The most active of the nitro-amino-di-phenyl-sufones synthetized by Mingoja and Berti was shown to be the formyl derivate, called 117 M (4-nitro-4 formulamino-di-phenyl-sulfone); the most active of the di-amino-di-phenyl sulfones is the deforyl de amido phenyl sulfone, known as "Formilone".

In 1943, Biocca and Grieco (unpublished data) for the first time succeeded in treating a case of human toxoplasmosis with the 117 M compound.

The authors had the opportunity to repeat Biocca's experiments with 117 M and Formilone as well as to test the activity of three other compounds not yet tested in the treatment of toxoplasmosis, namely sulfadiazine, diasone and dichlorone.

A single strain of Toxoplasma, isolated by one of the authors (Nobrega) from an outbreak of rabbit toxoplasmosis, was used throughout these studies; the strain is highly pathogenic for rabbits, mice, pigeons and chicks.

All tests were performed in mice and pigeons. The pigeons were inoculated intramuscularly and the mice, intraperitonially. The compounds were all administered subcutaneously when the animals were already in an advanced stage of the disease. For mice, which regulary die 6 or 7 days after inoculation, the treatment consisted of a single dose of 0.012 g per animal, given on the 3^{d} day after the inoculation. Pigeons, which usually die 10 or 11 days after the inoculation, were given 3 infections of 0.125 g each beginning on the 6th day after the inoculation.

As may easily be seen, the doses used were rather small, since the amount of 0.012 g per mouse corresponds to 0.5 g per kilogram of live weight.

The results of the experiments made are shown in tables 1 and 2. The conclusion is to be drawn that four of the compounds tested, namely 117 M, Formilone, Sulfadiazine, and dichlorone, are quite similar as regards therapeutic action against toxoplasmosis in mice. Mortality among animals treated with sulfadiazine and dichlorone averaged 30%, in comparison with 70 and 100% in the groups treated with sulfathiazole and diasone, respectively.

The results obtained in Pigeons are comparable with the ones described, but special emphasis should be placed on the action of sulfadiazine, which displays a very marked curative effect, since only one out of 10 inoculated birds dies, after a very protacted disease, and no parasites in its viscera.

All treated animals were reinoculated 30 days after the first inoculation shown to be completely resistant to the highy virulent strain of Toxoplasma. Further work is in progress, with a view to determining the nature of this resistance to reinfection.

CONCLUSIONS

Sulfadiazine and dichlorone, when administered subcutaneously in oil suspension, show a marked therapeutic action against experimental toxoplasmosis. Under similar conditions no activity whatever is shown by diasone.

As regards therapeutic action sulfadiazine, dichlorone, 117 M and Formilone are quite similar, and markedly superior to sulfathiazole.

All treated animals display complete resistance against reinoculation.

BIBLIOGRAFIA

1 — Biocca, E e R. Pasqualin — 1942 — A ação terapêutica de alguns compostos sulfanilamídicos na infecção experimental por toxoplasma. *Arq. Biol.*, **26**: 107-109.

2 — Biocca, E. — Quimioterapia sulfonica da toxoplasmose. *Arq. Biol.*, **27**: 7-10 e 63 e 89-91.

3 — Bioca, E. — 1944 — Toxoplasmose e seu tratamento quimioterápico. *Rev. Bras. de Med.*, **1**: 380-382.

4 — Mingoja, Q. — 1943 — Novas sulfonas quimioterápicamente ativas. *Arq. Biol.*, **27**: 4-7,

5 — Mingoja, Q. e F. Berti — 1943 — Novos derivados da 4-nitro-4'-amino-difenilsulfona. *Arq. de Biol.*, **27**: 55-60.

6 — Sabin, A. e J.Warren — 1941 — Therapeutic effect of the Sulfonamides on infection by an intracellular protozoon (Toxoplasma). *J. of Bact.*, 41: 80.

7 — Sabin, A e J. Warren — 1942 — Therapeutic effectiveness of certain sulfonamides on infection by an intracellular protozoon (Toxoplasma), *Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, **51**: 19-23.

8 — Weiman, D. e R. Berne — 1944 — Trerapeutic cure of acute experimental toxoplasmosis in animals, *Am. Med. Assoc.*, **124**: 6-8.

———o———

Vol. 16 — Art. 9 Novembro de 1945

OBSERVAÇÕES BIOLÓGICAS SÔBRE "COELOSTERNUS GRANICOLLIS (PIERCE)", BROCA DA MANDIOCA

POR

Oscar Monte

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 1 figura no texto e estampas 15-16

HISTÓRICO

A primeira referência a esta broca na literatura, foi feita por PIERCE (16) quando mencionou o inseto:" described from four specimens found alive in cassava (*Manihot*) stems from Brazil by H. L. SANFORD, at quarantine, Washington, District of Columbia, September 10, 1914." Posteriormente MOREIRA (15) publicou alguns dados biológicos e aconselhou os meios de combate a ela concernentes.

Ao descrever este curculionideo, PIERCE (16) o colocou no gênero *Leiomerus* (um nome manuscrito e hoje considerado "nomem nudum"), para cuja justificativa assim se expressou:

"The original usage of *Coelosternus* by Shalberg makes *balteatus* Shalberg the type of that genus, and it therefore replaces the erroneous use of *Cryptorhynchus* as found in Gemminger and Harold and other authors. The type of *Cryptorhynchus* Illiger was designated by Latreille in 1810 as *pericarpius* Linnaeus, which is also type *Rhinoncus*. In view of the fact that Schönherr's *Coelosternus* is left without a name, it is necessary to search for some other available name. The only name thus found is the manuscript name *Leiomerus*, established in the synonymy of *Coelosternus glabirostris* by Boheman, and henceforth quoted as a generic synonym of *Coelosternus* Schönherr. This name is therefore definitely chosen to represent the genus as redefined by Lacordaire (1866) (Gen. Col., vol. 7, 1866, p. 123) with *glabirostris* Boheman as type. It is principally characterized by single-jointed cylindrical club of the antennae."

Porém MARSHALL (9) discorda, com razão, do uso do nome *Leiomerus*, quando comenta:

"Mr. Pierce uses the generic name *Leiomerus* Boh., for his species, rejecting *Coelosternus* Sch., on the ground that the name was preoccupied by Shalberg. It is true that the latter author described a species of *Coelosternus* shortly before Schönherr's "Disposito methodica" appeared, for as he clearly explains, he

considered it desirable to follow Schönherr's new classification (with which he was obviously acquainted) even though it had not actually been published; and moreover he takes care to cite Schönherr as the author of the name of his insect. Sahlberg did not described the genus *Coelosternus*, nor did he cite a type, and there can be no scientific justification for using the name otherwise than is the sense clearly defined by Schönherr. Further the name *Leiomerus* was not established by Boheman, but was a MS name of Chevrolat's which Schönherr rejected, merely quoting it in the synonymy of *Coelosternus glabirostris*. The name should therefore be attributed to Pierce and sinks as a synonym of *Coelosternus* Schn."

GÊNERO *COELOSTERNUS* E SUAS ESPÉCIES; BROCAS DA MANDIOCA, NA AMÉRICA

O gênero *Coelosternus* SCHÖNH., 1826, segundo HUSTACHE (6) está espalhado nas faunas americana, africana e asiática. Contando-se as espécies que no Catálogo trazem a indicação América Meridional, o número das espécies brasileiras sobe a 50. Destas, somente 7 têm plantas hospedeiras conhecidas, todas pertencentes à família das Euforbiáceas.

Dentre as 50 espécies conhecidas, do Brasil, alem da que estudamos, mais as três que a seguir enumeramos são indicadas como brocas dos nossos mandiocais.

Coelosternus rugicollis BOH. criado por nós em mandiocais, em Minas Gerais, é a única espécie que encontramos naquele Estado, nesta planta. Posteriormente, em consultas que têm sido dirigidas ao Instituto Biológico, procedentes do Paraná, verificou-se que a espécie é comum nos mandiocais paranaenses e raramente encontrada em S. Paulo.

LABROY (7) cita-a no Ceará, vivendo em *Manihot glaziovii* MUELL. ARG., vulgarmente conhecida por Maniçoba ou Mandioca brava, naquele Estado.

Coelosternus manihoti MARSHALL é a broca dos mandiocais da Bahia, segundo BONDAR. MARSHALL diz ter examinado material proveniente da África, e provavelmente levado para aquele Continente, em ramas.

Coelosternus notaticeps MARSHALL, descrito de espécimens enviados da Bahia, por BONDAR, e colhidos em uma Euforbiácea indeterminada.

Fora da fauna brasileira são conhecidas as seguintes:

Coelosternus alternans BOH. é a broca dos mandiocais de Guadelupe e Antilhas, segundo PIERCE e confirmada por CALLAN.

Coelosternus sulcatulus BOH. broqueia os mandiocais de Porto Rico (2), ali introduzida de Guadelupe.

Coelosternus alternans BOH. e *C. tardipes* BOH. são as brocas indicadas para Trinidad. Destas, a primeira é a mais espalhada e de maior importancia.

Segundo CALLAN (2) parece haver confusão na verdadeira determinação da última das espécies, sendo provável que a estudada por este entomologista seja outra. CALLAN no trabalho citado dá pela determinação de MARSHALL a presença de *Coelosternus granicollis* como sendo uma das brocas estudadas por ele nos mandiocais de Trinidad, sendo a mesma que lhe havia sido comunicada por BUCHANAN, como *Coelosternus tardipes*.

Coelosternus tardipes BOH. é espécie largamente espalhada na América Central e no México, porém nos trabalhos de entomologia econômica publicados nestes países e que puderam ser consultados por nós, não vimos qualquer referência a ataques deste curculionideo.

Sem dúvida, pelo número de espécies descritas é bem diminuto o conhecimento que se tem da biologia das espécies deste gênero.

PLANTAS HOSPEDEIRAS

Alem da mandioca, não encontramos nenhuma planta hospedeira para esta espécie ou para qualquer outra do gênero *Coelosternus*. Pesquizamos cuidadosamente varias plantas da familia das Euforbiáceas e não encontramos em qualquer uma delas, siquer vestigios de broca. Nossas pesquizas se limitaram aos Estados de S. Paulo e Minas Gerais, e assim é provável que muitas das espécies de *Coelosternus* possam ter desenvolvimento nesta família botânica, porém cremos que as espécies que broqueiam a mandioca vivem exclusivamente nesta planta. A mandioca é uma planta cultivada em quase todos os lugares e permanece nos campos pelo espaço de uma cultura a outra, sendo pois os mandiocais a própria fonte de novas infestações.

CONSIDERAÇÕES SÔBRE A IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

De um modo geral não se pode afirmar que a cultura da mandioca seja totalmente danificada pela broca; vezes há porém, que os prejuisos são quase totais. Duas culturas por nós visitadas: Fazenda do Bosque, do sr. Nenê Junqueira, em Cordeiros, e Fazenda Santa Maria, de propriedade da Cia. Industrial de Tecidos, em S. Carlos, apresentavam-se grandemente danificadas, a tal ponto que muitas plantas se apresentaram mortas. Os estragos nesta última propriedade eram de tal monta, que não se pôde aproveitar grande parte da

cultura; da outra os tubérculos se apresentavam "aguados" e inutilisados para a produção de amido.

A praga é muito espalhada em todos os mandiocais, e, em nossas viagens pelo interior sempre a encontrávamos; porém em grande número dessas culturas os estragos eram relativamente pequenos. A cultura da mandioca em S. Paulo, como a do algodão, tomou também grande impulso, maximé quando se destinava à produção do alcool.

É muito dificil calcular os prejuisos causados pelo inseto, porém, em certas zonas, não devem eles ser pequenos. Embora seja a mandioca, como dissemos, uma planta de grande valor econômico, ela, não tem, como alguns outros produtos, financiamento garantido; daí o abandono, que se tem notado, de grandes áreas, em beneficio daquelas que estão produzindo maiores lucros. Mesmo em municipios cuja principal cultura era a de mandioca, esta produção tem diminuido bastante. Em consequencia deste fator, a broca tem diminuido consideravelmente.

O ataque do inseto ao caule, não permitindo a natural alimentação da planta, provoca um menor rendimento dos tubérculos. Entretanto é justo destacar que o rendimento desta cultura é variável, dependendo da natureza do solo, do clima, da variedade cultivada e da regularidade das chuvas. Para dificultar os cálculos, podemos adiantar que a produção por hectare pode variar de 150.000 quilos de raizes por hectare até 20.000, podendo-se admitir uma média de 50.000 quilos.

DESCRIÇÃO DOS ESTADIOS

O v o — Mede 0,98 mm de comprimento por 0,50 mm de largura. Cilindrico, arredondado nas extremidades; de colorido branco leitoso, liso e brilhante.

L a r v a — Ao nascer mede 0,95 mm e ao terminar seu ciclo atinge 13 mm de comprimento. É a larva comum dos curculionideos, de corpo fortemente curvado, de um amarelo-branco leitoso, com a capsula da cabeça castanha e mandibulas escuras. Ao nascer apresenta-se visivelmente mais engrossada na parte anterior do que na posterior; a cabeça é bem mais volumosa que o corpo, amarelo-palida com leve tonalidade acastanhada; mandibulas resistentes, fortes e avermelhadas. Depois o seu colorido torna-se crême, e o corpo, liso, porém com delicados pêlos sôbre cada um dos segmentos.

N i n f a — Colorido geral crême. Corpo e apendices delicados. Cabeça arredondada com seis tubérculos, dispostos dois atraz e quatro na frente, saindo, de cada um deles, um pêlo erecto e castanho-escuro.

Rostro alongado, alcançando um pouco alem da base dos élitros e do primeiro par de patas, e nele se encontrando oito cerdas castanho-escuras, assim dispostas: duas na base, quatro um pouco acima da inserção das antenas, e duas na metade, entre as antenas e a extremidade do rostro.

Antenas grossas, dirigidas antero-dorsalmente e deitadas contra a superficie do protórax; os segmentos não distintos e a clava e o funículo, não diferenciados, e sem nenhum pêlo em evidencia.

Olhos arroxeados, em parte cobertos pela base do rostro e pela parte antero-lateral do pronoto.

Pronoto liso, com doze tubérculos, saindo, de cada um, um pêlo castanho-escuro, 4 dos quais na parte superior, os 8 restantes laterais, 4 de cada lado. Dispersos pela superficie inúmeros espinhos, uns maiores outros menores, mas terminados em ponta escura.

Mesonoto provido de dois pares de tubérculos setigeros, de cada lado da área mediana. Metanoto com tres pares.

Os segmentos abdominais providos, cada um, com uma série de cerdas de tamanhos variaveis; dispostos em fileiras transversais, de mais ou menos 10, em cada um. As cerdas centrais são mais fortes. O ultimo segmento abdominal é provido de um par de fortes espinhos terminais.

Élitros com as tres ultimas saliencias suturais com uma série de pequenos espinhos, que as percorrem em toda a extensão, notando-se que a saliencia mediana tem maior numero de espinhos.

Patas sem nenhum carater distinto, salvo um par de cerdas longas no ápice dos fêmures.

Adulto — Colorido geral castanho-claro, com pequenas manchas brancas e castanhas nos élitros, devido a aglomeração, em certos lugares, de um maior numero de escamas; no pronoto tambem uma mancha mais distinta e branco-amarelada.

Cabeça convexa, rugosa, coberta com escamas amarelas e ovaladas, as da base menores do que as da fronte, condensando-se mais junto aos olhos. Estes são grandes, preto-brilhantes, granulados e regularmente separados.

Rostro preto-brilhante; rugoso e pontuado na base; e aí coberto com escamas espatuladas e filiformes, situando-se estas junto aos olhos; carenado no meio, até mais ou menos a sua metade, daí para diante castanho-escuro, brilhante, e levemente pontuado.

Antenas inseridas um pouco atraz do meio, castanho-claras com raros pêlos claros; a clava coberta com densa pubescencia acinzentada.

Protórax estreitado na frente, densamente coberto de escamas castanhas e branco-amareladas, estas dispostas na parte dorsal, junto à carena central e dos lados. As escamas são espatuladas, porem aqui e ali, sem disposição certa, muitas outras filiformes e erectas, todavia em maior número junto à cabeça.

Escutelo preto e liso.

Fig. 1 — *Coelosternus granicollis* (PIERCE), segundo PIERCE 1916.

Élitros mais largos do que o pronoto na base; ombros arredondados; os inter-espaços 3, 5, 7, e 9, com fortes e longas carenas, o 8º somente na base; os outros achatados. Nestes há fortes pontuações, dando origem cada uma delas, a uma pequena e afilada escama branco-amarelada. Toda a superficie dos élitros coberta por inúmeras escamas espatuladas e filiformes, castanhas e branco-amareladas, ora formando manchas de uma côr, ora da outra, ora misturando-se os dois coloridos, ora condensando-se em algumas zonas, ou deixando a descoberto a superficie lisa e preta dos élitros.

A parte inferior do corpo, segmentos abdominais e patas, muito escamosas, salvo os tarsos, que trazem pêlos alongados e amarelo-dourados, com exceção do ultimo segmento que os tem poucos.

Comprimento, 5,5 mm a 7 mm.

RESISTENCIA DAS ESPÉCIES DE MANDIOCA

Nas nossas observações não notamos variedade alguma preferida pela broca, nem mais resistente ao ataque desta. De um modo geral as nossas mandiocas são classificadas como: mandioca brava ou amargosa (*Manihot utilissima* POHL) e mandioca mansa ou doce (*M. aipi* POHL). Todavia a diferenciação destas duas espécies não está ainda feita cientificamente, dado que os botanicos consideram todas as nossas mandiocas, como *M. utilissima*.

Sem dúvida é geral entre os agricultores a aceitação das duas categorias acima referidas; porém JOÃO CANDIDO, em Manual da Mandioca, assim se expressa: "Em verdade, não se pode apontar com segurança absoluta este ou aquele caracteristico, quer seja na forma ou na côr, como sendo pertencente de fato a este ou aquele grupo. Não se sabe, enfim onde começa a mandioca mansa nem onde acaba a variedade tóxica; mesmo porque esta última, submetida a certas condições de cultura e de clima, pode tornar-se completamente inócua, do mesmo modo que a mandioca mansa pode transformar-se em variedade tóxica".

A broca ataca indiferentemente qualquer variedade de mandioca, pois a encontramos em plantas cultivadas, ou nas que eram indistintamente encontradas em capoeiras, terras abandonadas e já invadidas pelo mato.

No geral, a variedade mais cultivada é a Vassourinha, por ser a mais rendosa e de todas a mais resistente à bacteriose.

NATUREZA DO ATAQUE

Os estragos produzidos pelo adulto, em natureza, não têm grande importancia. Em laboratório eles são bem diferentes, como se poderá observar na fotografia da estampa 15, fig. *A*. Diariamente colocavamos uma pequena haste na placa de Petri (9,50 x 2,00 cm ou 19,00 x 10,00 cm), operação somente interrompida nos casos de ausencia momentanea, ou nos fins de semana.

O adulto corroe completamente toda a superficie da camada epitelial da haste, impedindo dessa maneira uma vida normal da planta.

A mandioca desenvolve-se com muita facilidade dentro de uma vasilha com água. Poucos dias depois, a haste aí colocada brota com

vigor, produzindo novos brotos e, em seguida, folhas; e, submetida a uma maior temperatura, cresce, alongando-se para cima.

Muitas de nossas experiencias foram feitas em pequenos insetarios construidos de madeira, com paredes de tela e vidro (2,50m x 1,50m) sendo tres de seus lados, de vidro e tela. O calor acumulava-se em seu interior produzindo o crescimento rapido e excessivo da planta. Aproveitando este fato, colocamos nesse insetario hastes atacadas e não atacadas pelo adulto, e verificamos que as primeiras não se desenvolviam, provando-se assim que os estragos produzidos pelo adulto são danosos. Entretanto, este ataque só se dava quando o inseto era preso em placas de Petri, não se observando quando o inseto tinha à sua disposição maior ambiente ou mais abundante alimentação. Neste ambiente os estragos eram pouco visiveis e não conseguimos que as fêmeas fizessem postura, o que era facilmente conseguido quando presos em placas de Petri.

No Campo de Experimentação que mantinhamos para estudos, as plantas novas sofriam bastante, quando não morriam. Muitas delas resistiam, restaurando seus tecidos, e cremos que destas plantas sái a segunda geração da praga, cuja infestação é bem maior, desde que a femea encontra mais elemento de vida. Se o ataque é intenso, a destruição das plantas é total (cultura de S. Carlos); em outros casos a planta resiste um pouco mais, embora sua produção seja reduzida e os tubérculos tenham pouco teor de amido, tornando-se "aguados"; se todavia o ataque é o comum, não se tem muito a temer.

Condições há, que muito concorrem para que o ataque da broca seja desastroso: é o momento em que a cultura não pode contar com fatores favoraveis ao seu desenvolvimento. Na ocasião em que ela mais precisa de chuvas, estas faltam, prejudicando o desenvolvimento normal da planta; e esta, sentindo um desequilibrio nas reservas acumuladas, acaba por definhar ou paralisar seu desenvolvimento, em prejuiso de uma boa produção.

A broca é ativa quase durante todo o ano; somente nos meses mais frios diminue sua atividade, o que aliás é comum nos insetos, com algumas exceções. Em laboratorio, a variação de atividade não é sentida, porque o inseto põe continuamente. As condições de temperatura, em certas zonas de S. Paulo, não chegam a afetar o desenvolvimento do inseto, mas temos notado que muitas espécies são mais abundantes nos meses em que a temperatura é mais baixa, sendo mais raras nas épocas mais abundantes das chuvas.

CRIAÇÃO EXPERIMENTAL

TÉCNICA USADA

Quatro foram os métodos usados para a criação do inseto:

1.º) — os insetos eram colocados, em número de 10 a 30 indivíduos, numa cuba de vidro de 18 centimetros de diametro por 10 de profundidade. Esta cuba era fechada em cima com tela metalica, que não permitisse a fuga dos insetos, e nela se colocavam hastes de mandioca, cortadas em pedaços de 10 centimetros;

2.º) — quando se dava o acasalamento, os pares eram separados e postos numa placa de Petri, de 9,50 x 2,00 cm., e numeradas. A haste de alimentação era mudada diariamente, e em seguida examinada para a contagem dos ovos;

3.º) — em vez da placa de Petri, usava-se um pequeno vaso que continha uma planta nova, a qual era coberta com um vidro de lampeão, que se aumentava à medida que a planta ia crescendo, juntando-se um outro vidro; ou esta técnica era modificada quando a planta tinha alcançado maior desenvolvimento, utilisando-se neste caso uma caixa de criação em que cabia perfeitamente um homem de pé;

4.º) — em Campo de Experimentação, num total de 600 plantas.

No segundo caso, diariamente, as hastes eram mudadas e examinadas, à procura dos ovos. Geralmente a fêmea só fazia a postura de um dos lados. Encontrado o ovo ou ovos, eram mudados, cada um, para uma nova haste, a qual se conservava em outra placa, tendo a mesma numeração do casal. As hastes que continham os ovos eram examinadas diariamente, para verificação do nascimento das larvas. Como os ovos eram colocados à vista, numa pequena excavação feita com um escalpelo, sobre o miolo da haste e em uma de suas extremidades, tornava-se facil o manejo.

Nascidas as larvas, eram por sua vez colocadas em hastes recem-colhidas, fazendo-se primeiramente uma pequena perfuração para facilitar sua penetração na medula. Cada haste continha somente uma larva.

Nos casos de recipiente menor com planta nova, ou recipiente maior, com planta mais desenvolvida, visava-se verificar qual o local peferido para a postura. Esta é quase sempre feita na parte inferior da planta. Não julgamos todavia, que esta postura seja feita diretamente no caule, porque há sempre, na natureza, um ramo seco que ficou nesse estado pelo ataque da larva; quebrando-se esse ramo na junção do caule, esta parte está corroida e cheia de serragem, encontrando-se a larva não mui longe daí.

No Campo de Experimentação escolhemos tres plantas e cobrimo-las, cada uma, com uma gaiola em que cabia perfeitamente um homem de pé; cada planta recebeu cinco casais de insetos e diariamente, por intermédio de uma lente, examinavâmo-las à procura de ovos. Infelizmente não foi possivel descobrir por esse processo o local da postura, pois o inseto o disfarça depois que a faz, não deixando qualquer vestigio, exteriormente.

Nas plantas do Campo de Experimentação faziam-se pequenos orificios com um estilete até alcançar a parte central do caule e colocávamos a larva; em seguida, fechávamos os orificios com um pequeno pedaço de esparadrapo, para impedir que a larva, recuando, caisse.

Como tinhamos muitas plantas, podiamos sacrificar uma por dia. Colocamos 200 larvas, em 100 plantas, ou seja duas em cada planta. O fracasso foi quase total: as larvas, na maior parte, logo no inicio da galeria, morriam. As poucas que se salvaram não passaram de 28, o que nos permitiu verificar que as larvas em insetário se desenvolvem mais rapidamente, e apresentam maior desenvolvimento, no mesmo praso, do que as que vivem em natureza.

DADOS BIOLÓGICOS

Para fazer a postura a fêmea perfura primeiramente a haste, quando a planta é mais nova. Ela corroe pouco a pouco a casca em sentido obliquo, e para isso apoia-se fortemente sobre o primeiro par de patas, e levantando-se sobre os outros dois inicia o trabalho. Ás vezes essa perfuração é feita somente na camada compreendida entre a endoderma e a medula (Estampa 15, fig. *B*), outras vezes, a fêmea retira um pouco da medula, formando uma cavidade, na qual será posto o ovo (Est. 15, fig. *C*).

Como já nos referimos atraz, nas placas de Petri, a fêmea dá preferencia a uma das extremidades, por se tornar mais facil a postura. Algumas delas fizeram a postura diretamente sobre a haste, como se vê na figura *D* da estampa 16, colocando os ovos indiferentemente deitados ou em pé. Muitas fêmeas iniciavam a postura na superficie da haste, para depois a fazerem em cavidades por elas abertas na casca ou diretamente na medula, aproveitando a extremidade da haste cortada; esta ultima modalidade era a mais comumente observada.

A fêmea do casal 1 fez a seguinte postura: 3 ovos na parte superficial, 3 diretamente na placa, e 1 na extremidade. Em se-

guida poz mais dois ovos, desta vez, porém, perfurando a casca, fugindo à rotina que vinha mantendo em colocar os ovos na extremidade. Muitas posturas só eram descobertas depois que as hastes eram abertas para os exames, porque o inseto disfarçava o local da incisão, pois nada se notava a olho nú.

PROPORÇÃO DOS SEXOS

A proporção dos sexos é mais ou menos igual. E' muito dificil distingui-los, porque a fêmea ora é maior, ora menor. O inseto varia outrossim em suas medidas. A impressão geral que se tem, é de que os machos são de maior tamanho, em grande numero de casos. Não conseguimos um caracteristico externo, com que se podesse, a vista desarmada, distinguir o macho da fêmea. Em muitos casais que examinamos, o macho era mais robusto e mais escamoso, principalmente no disco pronotal.

PIERCE diz que as fêmeas por êle examinadas eram menores do que os machos, e que todas elas variavam no colorido. Nos especimens frescos as escamas apresentavam-se castanho-escuras e muitos exemplares tinham maior numero de escamas brancas do que outros.

A criação foi feita numa placa de Petri das grandes: 18 x 10 cm, e à proporção que os insetos se acasalavam, eram separados e contados os sexos. Num total de 40 exemplares postos numa placa, 18 eram femeas e 22, machos.

CÓPULA

A cópula dá-se durante todo o dia e inicia-se 3 a 4 dias depois de nascidos, isto é, depois que o adulto abandona a célula ninfal. Parece-nos que espera o tempo necessário para o endurecimento do tegumento, para iniciá-la. O macho se mantem sobre a fêmea por praso muito longo (pelo menos durante todas as horas de expediente ou nas em que permaneciamos em laboratório). E' muito ativo e copúla mais de uma vez, e mesmo levado ao microscópio, quando em cópula, não larga a fêmea. Enquanto esta se alimenta o macho a cavalga, ficando imoveis horas e horas. Levado ao microscópio, o macho retira o penis e fica com êle de fóra por muito tempo; se não sente qualquer perturbação, fica nesse estado por mais de meia hora; ás vezes o introduz novamente na fêmea, ou recolhe-o, continuando porem agarrado a ela, até que sinta qualquer disturbio. Quando virávamos o caule, e por conseguinte produziamos qualquer perturbação em seu sossego, o macho se apoiava sobre as patas trazeiras, levantando a parte anterior do corpo e cabeça, movimentava as antenas, e assim

permanecia até que sentisse voltar o sossego novamente; sendo perturbado imediatamente a esta atitude, largava-se da fêmea; caso contrario, abaixava-se e procurava iniciar novamente a cópula, mas nem sempre isso se dava, porque muitas vezes se mantinha sómente em ameaça, sem introduzir o penis.

O periodo de preovoposição é muito variavel, dependendo de um fator individual, queremos crer, porque casais observados sob as mesmas condições, faziam a postura no dia seguinte ao em que eram separados, enquanto outros demoravam bastante a iniciá-la.

POSTURA

Para contrôle de postura foram separados 10 casais, um dos quais deixou de pôr ovos. A relação desses casais é apresentada na tabela 1.

A fêmea inicia a postura três dias depois de coberta, continuando a copular intermitentemente. Uma só cópula é suficiente para tornar essa fêmea fecunda, e tivemos ocasião de separar uma delas, depois de ter permanecido em companhia do macho, em 1.º de junho, e a sua postura durou até 29-XII, do mesmo ano, ou sejam 212 dias; e tendo morrido nesta data, poz 159 ovos. Outro casal, em que o macho morreu em 26 de janeiro, a fêmea continuou a postura até 31 de julho.

Na tabela seguinte em que relacionamos o tempo de postura e o número de ovos, poder-se-á verificar a media diária da oviposição.

TABELA 1
Postura de ovos

Casal	Dias	Número de ovos	Média diária
1	124	144	1,01
2	326	292	0,89
3	324	289	0,89
4	273	303	1,10
5	40	73	1,82
6	36	35	0,97
7	—	—	—
8	301	212	0,70
9	309	213	0,70
10	358	374	1,04
	2.091	1.935	

A media geral obtida é de 0,92, não chegando a um ovo diario. Dos 10 casais, 4 tiveram uma média de mais de 1 ovo; 5 deles não alcançaram esta postura; e um, pelo fato de não ter feito postura, não foi computado.

Na tabela que se segue, apresentamos a relação dos 10 casais com o inicio da postura, seu término e número de ovos de cada um. Nas seguintes escolhemos duas larvas dentre as inúmeras que foram criadas, cujo desenvolvimento diário pôde ser observado. No cômputo geral o desenvolvimento coincidiu perfeitamente, o que nos dispensa de apresentar as tabelas das outras.

O ovo dava eclosão dentro de 4-5 dias; poucas vezes apresentou menos do que 5. A larva tem um tempo mais variavel, como vemos das duas tabelas juntas. Uma delas 54 dias, e a outra 67, ou seja uma diferença de 17 dias. Esta diferença foi, ora para mais, ora para menos, mas a média geral variava entre 54 e 67 dias. Uma delas chegou a 92 dias, porém não sabemos explicar a razão, porque todas as condições eram identicas às das outras. O tempo ninfal foi bem constante, de 20 a 22 dias.

No resumo apresentado debaixo de cada tabela poder-se-á conhecer o ciclo evolutivo do inseto, que nos dois quadros variou de 79 a 94 dias, ou seja uma médiá de 86 dias.

TABELA 2

Controle da postura de 10 casais

N.º Casal	Data da cópula	Início da postura	Término da postura	N.º de ovos	Observações
1	20-I-1943	23-I-1943	27-V-1943	144	♂ morreu em 6-VI-43
2	23-I-1943	26-I-1943	18-XII-1943	292	♀ " " 19-XII-43
3	28-I-1943	1-II-1943	21-XII-1943	289	♂ " " 1-VI-43 ♀ " " 22-XII-43
4	21-II-1943	25-II-1943	24-XI-1943	303	♂ " " 26-II-44 ♀ " " 18-XII-43
5	23-II-1943	28-II-1943	8-IV-1943	73	♀ " " 8-IV-43
6	28-II-1943	2-III-1943	6-IV-1943	35	♀ " " 6-IV-43
7	2-III-1943	—	—	—	Ficou um mês em observação e não fez postura.
8	2-III-1943	4-III-1943	29-XII-1943	212	O casal morreu em 12-1-1944.
9	4-III-1943	6-III-1943	8-I-1944	213	♂ morreu em 29-XII-43 ♀ " " 9-II-44
10	8-X-1943	12-X-1943	5-X-1944	374	♀ " " 6-X-44 ♂ " " 25-XI-44

Pela tabela acima verifica-se que após tres dias, em média, depois da cópula, a fêmea inicia a postura. A morte do inseto depende de fatores que não nos é possivel indicar, porquanto foram criados no mesmo ambiente e nas mesmas condições. A maior duração foi do casal que iniciou a postura na entrada do verão; entretanto, verifica-se, outrossim, que o casal 4 deu inicio à sua postura em fins de fevereiro, ou seja quase no final da estação e também produziu uma boa postura, somente um pouco inferior ao casal 10, acima referido.

TABELA 3

Desenvolvimento da larva n.º 10

Datas	Medidas da larva (milímetros)	Medidas das galerias (centímetros)	Observações
28 - III (nasceu)	0,95		
30 - III	1,36	0,70	1.ª muda
1 - IV	2,50	1,50	
6 - IV	4,00	3,00	2.ª muda
7 - IV	6,00	3,00	
8 - IV	6,00	2,50	
9 - IV	6,00	3,50	
11 - IV	6,00	4,00	
13 - IV	7,00	5,50	3.ª muda
14 - IV	7,00	3,00	
15 - IV	8,00	5,50	
16 - IV	8,00	5,50	
17 - IV	9,00	5,50	
18 - IV	9,00	5,00	
20 - IV	9,00	5,50	
23 - IV	10,00 (1 cm)	4,50	4.ª muda
24 - IV	10,00	4,50	
25 - IV	10,00	6,50	
27 - IV	11,00	7,00	
28 - IV	11,00	5,50	
29 - IV	12,00	6,50	
30 - IV	12,00	6,50	
2 - V	12,00	7,00	
4 - V	12,00	7,50	
5 - V	13,00	3,50	
6 - V	13,00	5,50	
9 - V	13,00	6,00	
11 - V	—	—	Preparando a câmara ninfal
13 - V	—	—	Idem
18 - V	—	—	Pre-ninfal
20 - V	—	—	Pre-ninfal
21 - V	—	—	Ninfa
10 - VI	—	—	Adulto

RESUMO

Ovo	23 - III		
Larva	28 - III	5	dias
Ninfa	21 - V	54	»
Adulto	10 - VI	20	»
Total	23 - III a 10 - VI	79	»

RESUMO DO DESENVOLVIMENTO DA LARVA

Nascimento	28 - III		
1.ª muda	30 - III	2	dias
2.ª muda	6 - IV	6	»
3.ª muda	11 - IV	5	»
4.ª muda	23 - IV	11	»

TABELA 4

Desenvolvimento da larva n.º 11

Datas	Medidas da larva (milímetros)	Medidas das galerias (centímetros)	Observações
28 - III (nasceu)	0,95	....	
30 - III	1,36	0,70	1.ª muda
11 - IV	2,50	2,00	
6 - IV	4,00	3,50	
7 - IV	5,00	2,50	
8 - IV	5,00	3,00	
9 - IV	6,00	3,50	
11 - IV	6,00	3,00	2.ª muda
13 - IV	7,00	5,50	
14 - IV	7,00	5,50	
15 - IV	8,00	6,50	
16 - IV	8,00	5,00	
17 - IV	9,00	3,00	
18 - IV	9,00	5,50	
20 - IV	9,00	4,50	3.ª muda
23 - IV	10,00 (1 cm)	6,50	
24 - IV	10,00	6,50	
25 - IV	10,00	7,00	
27 - IV	11,00	7,00	
28 - IV	11,00	5,50	
29 - IV	12,00	5,00	
30 - IV	12,00	5,50	
2 - V	12,00	5,50	4.ª muda
4 - V	12,00	7,00	
5 - V	12,00	7,00	
6 - V	12,00	5,00	
7 - V	12,00	7,00	
11 - V	12,00	7,50	
13 - V	12,00	6,00	
16 - V	12,00	4,00	
18 - V	12,00	3,50	
20 - V	12,00	3,00	
21 - V	13,00	1,50	
23 - V	13,00	2,00	

(Continuação)

Datas	Medidas da larva (milímetros)	Medidas das galerias (centímetros)	Observações
25 - V	13,00	1,00	
27 - V	13,00	1,00	
28 - V	—	—	Preparando-se para a ninfose
30 - V	—	—	Idem
1 - VI	—	—	Pre-ninfal
3 - VI	—	—	Pre-ninfal
4 - VI	—	—	Ninfa
26 - VI	—	—	Adulto

RESUMO

Ovo	23 - III		
Larva	28 - III	5	dias
Ninfa	4 - VI	67	»
Adulto	26 - VI	22	»
Total	23 - III a 26 - VI	94	»

RESUMO DO DESENVOLVIMENTO DA LARVA

Nascimento ...	28 - III		
1.ª muda	30 - III	2	dias
2.ª muda	11 - IV	11	»
3.ª muda	20 - IV	9	»
4.ª muda	2 - V	11	»

CICLO EVOLUTIVO DA LARVA

A larva mede, ao nascer, 0,95 mm. Como em laboratorio eram dados, ao adulto, pequenos pedaços de hastes de 8 cm de comprimento, para a sua alimentação, a postura era quase sempre feita em uma das extremidades, por ser a parte mais tenra. O ovo era introduzido na medula (miolo) sob a qual ficava escondido. Nascida a larva, esta penetrava pouco a pouco na parte mole, lançando para fora a serragem em mistura com as dejeções. A galeria aberta por uma larva recemnascida era de 1,5 cm, no inicio.

Nas tabelas 3 e 4 apresentamos o desenvolvimento de duas larvas, estando numa das colunas o desenvolvimento da larva, e na outra o comprimento da galeria aberta, diariamente, por ela. Nota-se que, logo depois da mudança de pele, o comprimento da galeria diminue. Em mandiocais no campo a larva não perfura em comprimento, desde que tem maior quantidade de alimento a sua disposição; e nesse caso, o que perde em comprimento adquire em largura. Muitas vezes, em vez de fazer a perfuração num orificio continuo, a larva o fazia depois de perfurar 2 mm horizontalmente, mudava de direção para a vertical, fazendo uma pequena excavação, para depois continuar novamente no sentido horizontal; outras vezes, depois de um pequeno percurso, alargava essa galeria numa pequena

camara de 1 cm de diametro. No final das primeiras 48 horas, a larva media 1,36 mm, e perfurava uma galeria de 15 mm. Nesta ocasião muda de pele.

A' proporção que a larva aumentava de tamanho, eram-lhe fornecidas hastes mais grossas e consistentes, tendo um centimetro de diametro e 16 centimetros de comprimento.

Quando o ovo é depositado na superficie da haste, a larva o força pela parte abdominal, que é a primeira a emergir. Conseguido o seu primeiro intento, que é de livrar o abdomen, ela continúa em movimentos para direita e para esquerda, com os quais vai pouco a pouco empurrando a casca para a parte da cabeça. Neste objetivo, leva pelo menos 10 horas. Muitas delas, terminada a operação, largam-se do ovo; outras porem, não conseguem desvencilhar-se dele, ficando presas pela cabeça, que não se destaca do ovo, por maiores que sejam os esforços dispendidos, e morrem.

A larva criada de caules em placa de Petri alcançam maior desenvolvimento do que as que são criadas em plantas no campo. Alem de mais longas apresentam-se bem mais robustas. Nas galerias naturais a larva come todo o conteúdo da medula, deixando em grande parte completamente vasia a haste, enquanto nos pedaços de hastes postas em placa de Petri, a tendencia da larva é caminhar.

Como se pode vê nas tabelas numeros 2 e 3, a larva muda 4 vezes de pele. O numero de dias é variavel: numa delas durou 24 dias e na outra 33. Do nascimento à 1.ª muda, 2 dias; da 1.ª para a 2.ª, 6 e 11 dias, respectivamente; da 2.ª para a 3.ª, 5 e 9; da 3.ª para a 4.ª, 11 e 11 dias.

Houve uma constancia do nascimento para a 1.ª muda, e da 3.ª para a 4.ª, porém nas duas mudas intermediárias, uma delas levou quase o dobro de dias, da outra.

Quando a larva está prestes à ninfose, constroe uma camara, que é excavada no fim da galeria, tapando as duas extremidades com serragem, e alargando a parte em que vai repousar. Prepara uma facil saida para o adulto, deixando uma leve camada que o futuro besouro poderá, com pouco esforço, romper. (Vide estampa 16, fig. *F*). Todavia muitos adultos podem escapar, nas hastes em laboratorio, pela extremidade fechada com serragem, que se endurece.

Terminado seu ciclo larval, leva nos preparativos de ninfose, uma semana, até que tome a semelhança do futuro inseto. O inseto depois de obter a forma perfeita, permanece por algum tempo dentro da célula ninfal, até que seus tegumentos endureçam, e mesmo, cremos, esperando época mais propícia para romper a galeria e sair.

FATORES QUE AJUDAM O DESENVOLVIMENTO DA BROCA

O método de colheita da mandioca controla bastante o desenvolvimento da praga. O arrancamento de toda a plantação, que em seguida é juntada e queimada no proprio campo, impede que a praga tome maior vulto, e venha assim a tornar-se um problema economico. Entretanto, muitos cultivadores deixam por muito tempo seus mandiocais no campo, maximé quando estes não são destinados à industria. Tais mandiocais tornam-se um foco de desenvolvimento para o inseto. Outrossim é necessario observar que na maior parte dos quintais há sempre um ou mais arbustos que servem ao gasto caseiro, e que são outros tantos focos de disseminação.

Vimos, em Cordeiros, um mandiocal totalmente devastado pela ação da broca, e segundo informações de seu proprietario, os tuberculos eram completamente inutilisados porque ficavam "aguados". Mesmo para a alimentação esses tuberculos não eram indicados.

A mandioca é uma planta de duração mais ou menos prolongada, o que permite hospedar sempre o inseto. A broca é por isso encontrada durante quase todo o ano, a menos que não haja plantações; mas como acima nos referimos, este fato dificilmente se dá.

Pelas observações em laboratrio é de crer que no campo possa se repetir, o fato da oviposição contínua e, portanto, o desenvolvimento larval durante todo o ano; em laboratorio tivemos femeas que puzeram ininterruptamente durante 12 meses, pondo um total de 374 ovos (Vide tabela 1).

Nos meses frios, em laboratorio, a temperatura média foi de 16 ° graus, e a postura não se paralisou.

DISSEMINAÇÃO

E' do conhecimento geral que ao chegar ao Brasil, os portugueses já encontraram cultivada a mandioca pelos nossos indigenas. Muitos dos historiadores e naturalistas que escreveram as suas impressões de viagens referem-se ao cultivo desta planta em todos os lugares por onde passaram, e todos são unanimes em dizer que a mandioca era cultivada tanto pelos civilisados como pelos indios.

Sendo planta de facil cultivo e tendo uma infinidade de aplicações, sem dúvida a sua fama percorreu todos os recantos, e daí a grande procura que teve e o grande interesse que despertou o seu cultivo.

VON DEN STEINEN informa que os indios Bacairís, antes de conhecerem os civilisados, já cultivavam a mandioca. E' bem provavel que aos indios se deva o conhecimento das utilidades desta planta e dos produtos que ela pode produzir.

O plantio é feito por estacas (pedaços de rama) e o inseto sem dúvida é disseminado no transporte das estacas de local a local. Aliás esta bróca foi descrita de material vivo encontrado em ramas de mandioca enviadas do Brasil para os Estados Unidos, e interditadas no *Plant Quarentine,* desse último país.

O transporte de ramas, operação muito comum no meio agricola, é feito não somente pela necessidade de obtenção de ramas mais selecionadas, como pela falta, muitas vezes, de quantidade suficiente para o plantio. Nesse transporte muitas ramas levam os ovos, larvas ou ninfas, que evoluem, sendo por conseguinte esse o fator principal para uma maior disseminação da espécie.

O fato do inseto ter sido descrito de material colhido nos Estados Unidos, e retirado de ramas que para lá foram enviadas, mostra bem como deve estar espalhada esta broca por toda a América, principalmente em lugares onde os serviços de Vigilancia Vegetal não são feitos ou se apresentam pouco rigorosos. Segundo MARSHALL, *C. granicollis* é citada na Africa, tendo por conseguinte sua distribuição geográfica fora do continente americano.

MEIOS DE COMBATE

Vivendo o inseto dentro do caule, torna-se impraticavel um processo de combate eficiente, que o atinja diretamente, seja com aplicações de inseticidas para envenenar as partes de que êle se alimenta, seja por um método mais direto.

Têm-se aconselhado, como meios mais eficazes para seu combate, os seguintes:

a) — colher as partes atacadas, queimando-se em seguida para evitar o desenvolvimento dos besouros;

b) — não deixar, depois da colheita, restos de hastes ou qualquer outra parte da mandioca, abandonadas no campo, e sim queimá-las, pois nessas hastes se resguardam os adultos e evoluem muitas larvas que ainda não tinham alcançado o seu completo desenvolvimento;

c) — proceder a uma aração imediatamente depois da limpesa do campo, afim de expor á intempérie, qualquer rama que tenha permanecido enterrada;

d) — em casos de maior infestação, fazer a rotação de culturas, por um ou dois anos, afim de afastar a broca do local, ou fazer o plantio o mais afastado possivel das áreas anteriormente plantadas.

Agradecimentos são devidos ao sr. Benevides Siqueira, que nos prestou excelentes serviços, durante as nossas observações e trabalhos com esta broca.

BIOLOGICAL OBSERVATIONS ON "COELOSTERNUS GRANICOLLIS (PIERCE)", A PEST OF CASSAVA

Abstract

During the years 1942 to 1944 the author made some ecologic investigations of the cassava borer Coelosternus granicollis (Pierce). This weevil has been known as a pest of cassava (Manihot utilissima Pohl), since 1916.

Seven species of Coelosternus have been recorded as borers of cassava, four of which exist in Brazil. The list of the American and Brazilian species is given.

Other host plants are unknown, all the species of Coelosternus having been found on Manihot.

The adults feed on the stems and the young larvae bore into the center of the stems, resulting in damage to the plants from the galleries bored by the larvae.

Technical descriptions of the adult and immature stages are given.

The life cycle of the species is described.

The proportion of sexes is approximately equal.

Under insectary conditions the oviposition is made in or on the stems. Sometimes the female bores a hole in which the eggs are laid, other times the insect lays its eggs in one of the tips, preferably. The grub bores into the host tissues and stays there until ready to pupate. The first stage covers 2 days; the second from 6 to 11 days; the third 5 to 9 days; and the last 11 days. The construction of the cell was begun from the 38th to the 59th days of life, and the time from the construction of the cell to pupation varied from 7 to 9 days.

The average number of eggs to a female is 1.01%.

The time from emergence to first mating is 2 days, and oviposition begins from 3 days after the copulation.

Methods are suggested for pest control:

Removal of infested stems, which should be burnt, and destruction of the remains of plants left in the fields after harvest; crop rotation; ploughing to expose to the air parts of plants remaining underground.

BIBLIOGRAFIA

1 — Bondar, G. — 1941 — Notas entomológicas da Bahia, VIII. *Rev. Ent.*, Rio de Janeiro, 12 (3) : 440.

2 — Callan, E. Mc C. — 1942 — Notes on cassava weevil-borers of the genus Coelosternus (Col. Curculionidae). *Rev. Ent.*, Rio de Janeiro, 13 (3): 304-308.

3 — Callan, E. Mc C. — 1943 — Cassava weevil-borers of the genus Coelosternus. — A correction., *Rev. Ent.*, Rio de Janeiro, 14 (1-2) : 30-31.

4 — Champion, G. C. — 1906 — Biologia Centrali-Americana, Col. IV : 514.

5 — Costa Lima, A. M. — 1936 — *Terceiro Catálogo dos insetos que vivem em plantas do Brasil.* Min. da Agric., Rio de Janeiro, p. 342.

6 — Hustache, A. — 1936 — Catalogus Coleopterorum, pars 151 : 196-201.

7 — Labroy, O. — 1913 — A borracha no Brasil. *Publ. Min. Agr. Ind. Com.*, Rio de Janeiro. p. 132.

8 — Leonard, M. D. — 1930 — A little known root weevil of cassava (Coelosternus sulcatulus Boh.). *Jour. Dept. Agr.*, P. R., 14 (3) : 159-165.

9 — Marshall, G. A. K. — 1922 — Some injurious neotropical weevils (Curculionidae). *Bull. Ent. Res.*, 13 : 66.

10 — Marshall, G. A. K. — 1925 — On new curculionidae from Brazil (Coleoptera). *An. Mag. Nat. Hist.*, 15 : 282-296.

11 — Monte, O. — 1932 — A coleobroca da mandioca, Coelosternus rugicollis Boh., *Cha. e Qui.*, 46 (6) : 653-654, 2 figs.

12 — Monte, O. — 1938 — Mandioca, pragas e seus combates. *Cha. e Qui.*, 57 (1) : 183-197, 14 figs.

13 — Monte, O. — 1940 — Coleobrocas da mandioca. *O Biologico*, S. Paulo, 6 (1) : 15-18, 4 figs.

14 — Monte, O. — 1942 — Manual da Mandioca. As pragas e seu combate. Ed.: *Cha. e Qui.*, 75-98, 40 figs.

15 — Moreira, C. — 1923 — A broca da mandioca, Leiomerus granicollis Pierce. *Cha. e Qui.*, 27 (6) : 517-518, 3 figs.

16 — Pierce, W. D. — 1916 — Studies of weevils (Rhynchophora) with description of new genus and species. *Proc. U. S. Nat. Mus.*, 51 : 469-471.

17 — Wolcott, G. N. — 1933 — An economic entomology of the West Indies, San Juan, P. R., p. 658.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Coelosternus granicollis (PIERCE)

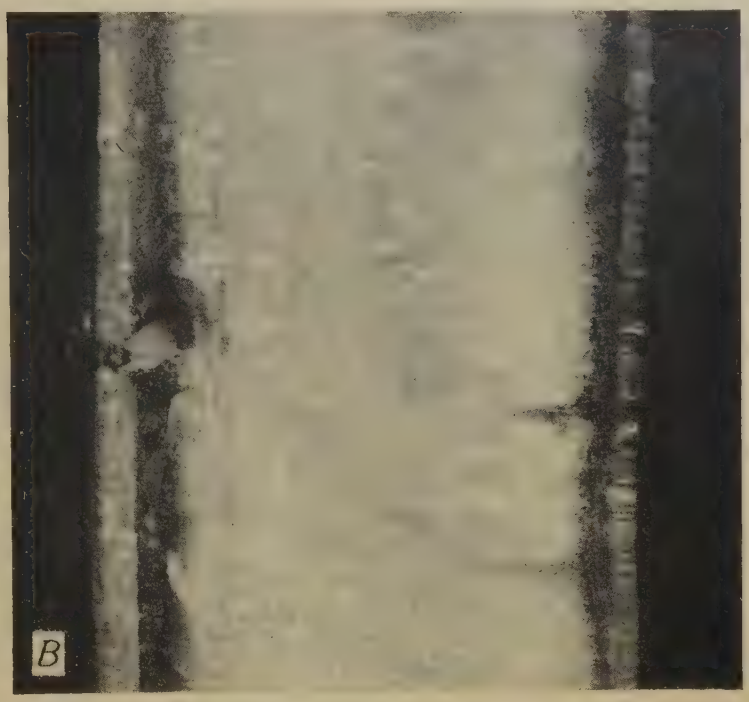
Estampa 15

Fig. *A* — Pedaço de haste corroida pelos adultos.
Fig. *B* — Uma haste cortada ao meio, deixando ver o ovo introduzido.
Fig. *C* — Haste aberta, mostrando dois ovos inclusos na parte mole (miolo).

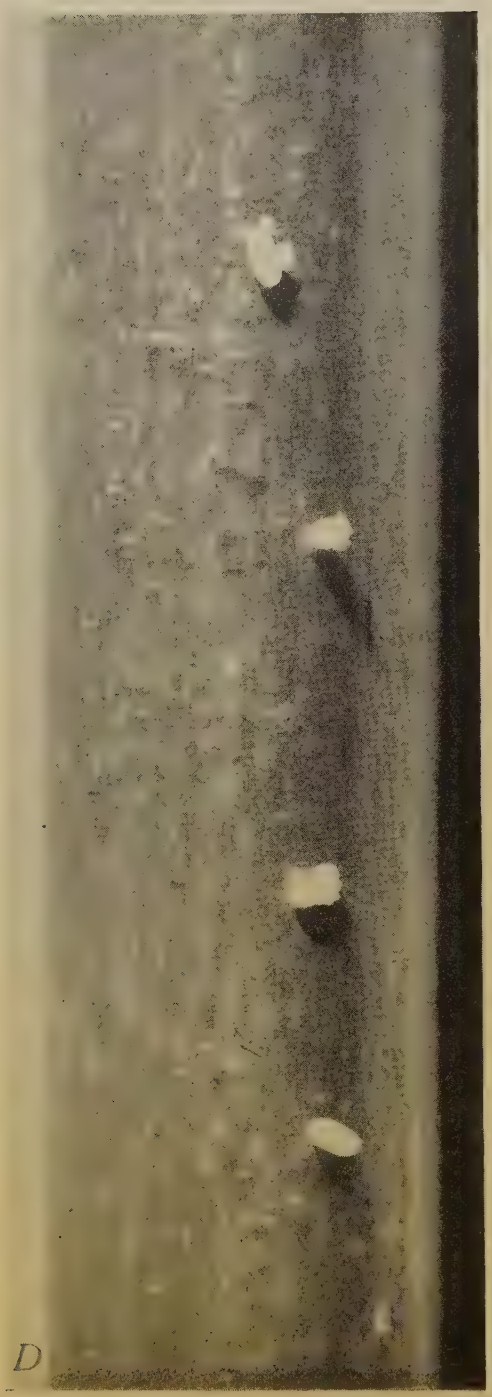
Estampa 16

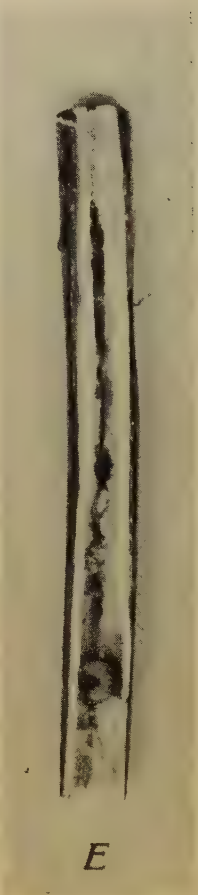
Fig. *D* — Por vezes o inseto faz a postura em cima da haste.
Fig. *E* — Haste broqueada pela larva no seu primeiro estadio.
Fig. *F* — Camara de ninfose do inseto, vendo-se um maior alargamento, sendo que a mesma está fechada por serragem, em *a*.

A


B

C


D


E

a
F

SÔBRE O TEMPO DE APARECIMENTO E DURAÇÃO DA IMUNIDADE NOS EMBRIÕES E PINTOS DE GALINHAS VACINADOS CONTRA A ESPIROQUETOSE

POR

P. Nobrega e A. S. Reis

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Em 1906 LEVADITI (4) observa que o espiroqueta das aves não se multiplica em embriões provenientes de ovos de galinha imune à espiroquetose; o autor infeta uma galinha e verifica que os embriões que se desenvolvem em ovos postos a partir do 22.º dia da infecção, ou 18.º dia do restabelecimento do animal, são absolutamente refratários à inoculação de espiroqueta. LEVADITI sugere ser a imunidade de natureza provavelmente passiva, e observa que os espiroquetas são ràpidamente imobilizados quando postos em contato com a clara e sobretudo com a gema de ovos de galinhas restabelecidas da infecção.

O trabalho de de LEVADITI é confirmado por KROÓ e ORBANEJA, que demonstram a existência de anticorpos protetores na gema e na clara, com um título duzentas vezes mais forte na primeira do que na última; além disso o sôro de pintos de um dia de idade, de galinhas imunes, apresenta propriedades espiroqueticidas. KROÓ (1,2) observa ainda que pintos de um dia, atacados de espiroquetose, apresentam, ao contrário das aves adultas, uma infecção que se prolonga por 16-21 dias, fenômeno relacionado com a falta de produção de anticorpos em animais muito novos; com efeito, a vacinação de pintos de um dia não protege os animais contra a espiroquetose em provas feitas de 3 a 21 dias após a vacinação, enquanto nas aves adultas há produção de imunidade absoluta em 48-72 horas. Em pintos de 4 semanas de idade a duração da moléstia passa a ser igual à dos adultos (3 a 5 dias) e a vacina já provoca imunidade.

O presente trabalho tem por fim verificar certos aspetos da imunidade não referidos nos trabalhos anteriores, tais como a determinação do prazo que decorre entre a vacinação das galinhas e o aparecimento de imunidade nos embriões e pintos, assim como a duração da imunidade passiva nos pintos provenientes de galinhas imunes.

MATERIAL E MÉTODOS

Para verificação do tempo de aparecimento e duração da imunidade, respectivamente nos embriões e pintos provenientes de ovos de galinhas imunes, 20 galinhas Leghorn são vacinadas contra a espiroquetose, com a vacina preparada no Instituto Biológico, a qual produz imunidade absoluta em 48 horas. Os ovos dessas galinhas já préviamente acasaladas, assim como das galinhas normais não vacinadas, são recolhidas a partir do terceiro dia após a vacinação, e incubados. Uma parte dos ovos se destina à produção de pintos; outra parte é separada no 12.º dia de incubação para o fim de se verificar a sensibilidade dos embriões à inoculação de espiroquetas. A inoculação dos embriões é feita de acôrdo com a seguinte técnica:

1) No 12.º dia de inoculação examinam-se os ovos no ovoscópio e assinala-se externamente a posição do embrião, depois de verificar a vitalidade dêste.

2) Com estilete faz-se pequeno orifício na casca, na região da câmara de ar, a fim de impedir aumento da pressão no interior do ovo e refluxo do inóculo no momento da inoculação do embrião.

3) Perfura-se igualmente a casca, depois de desinfetada, num ponto da região assinalada no 1.º tempo.

4) Através dêsse orifício *injetam-se* 0,05 a 0,1 cm^3 de sangue de galinha rico de espiroquetas (sangue de galinha no 4.º dia de infecção diluido a 10% em água fisiológica citratada).

5) Fecham-se com parafina estéril ambos os orifícios feitos na casca e recolocam-se os ovos inoculados na chocadeira.

A verificação de espiroquetas é feita 3-5 dias após a inoculação, utilizando-se para êsse fim o sangue do coração dos embriões, examinado diretamente em campo escuro.

Os pintos provenientes de galinhas vacinadas e normais são inoculados com espiroqueta, alguns no primeiro dia de vida, outros depois de prazos diversos; a existência ou ausência de espiroquetas é verificada pelo exame, em campo escuro, do sangue retirado da veia da asa.

RESULTADOS

A tabela 1 mostra o prazo necessário para o aparecimento de imunidade em embriões provenientes de galinhas prèviamente vacinadas contra a espiroquetose.

TABELA 1

Inoculação de espiroqueta em ovos embrionados de galinhas vacinadas contra a espiroquetose, e de galinhas normais

Época de postura dos ovos	N.º de ovos	Inf. dos embr.		% de inf. dos embr.
		+	—	
3-13 dias após vacinação . .	81	80	1	98
15-20 " " " . .	20	2	18	10
21-35 " " " . .	60	5	55	8
35-39 " " " . .	46	5	41	98
Ovos de galinhas não vacinadas	70	69	1	98

Os resultados da tabela 1 são muito expressivos e demonstram que a imunidade nos embriões sòmente se manifesta cêrca de 2 semanas após a vacinação. Ovos recolhidos antes dêsse período se comportam exatamente como os das galinhas normais, não vacinadas. Êste resultado é curioso, porque dada a imunização das galinhas em 48-72 hs, era de esperar a existência de imunidade nos ovos postos depois do 3.º dia da vacinação. Aliás a tabela seguinte demonstra que os pintos provenientes de ovos postos na primeira semana após a vacinação são, na grande maioria, sensíveis à inoculação de espiroqueta.

TABELA 2

Inoculação de espiroquetas em pintos de um dia de idade, filhos de galinhas vacinadas contra a espiroquetose, e de galinhas normais

Época de postura de ovos	N.º de pintos	Infecção dos pintos		% de inf. dos pintos
		+	—	
3-7 dias após vacinação . .	20	16	4	80
10-16 dias após vacinação . .	20	4	16	20
Ovos de galinhas não vacinadas	20	20	0	100

Verifica-se assim que os ovos de galinhas vacinadas contra espiroquetose, recolhidos até 7 dias após a vacinação, dão origem a pintos, na sua quase totalidade, sensíveis à inoculação de espiroqueta; inversamente, os pintos provenientes de ovos postos de 10-16 dias após a vacinação são, na sua grande maioria, resistentes à espiroquetose.

Quanto à duração da imunidade passiva em pintos filhos de galinhas vacinadas contra a espiroquetose, os dados da tabela 3 são bastante elucidativos:

TABELA 3

Duração da imunidade passiva nos pintos filhos de galinhas vacinadas contra a espiroquetose

Idade dos pintos	N.º de pintos	Infecção pelo espiroqueta		% de infecção
		+	—	
1 dia	10	0	10	0
5 dias	10	0	10	0
10 "	10	0	10	0
14 "	10	0	10	0
17 "	10	7	3	70
20 "	10	10	0	100
Pintos normais	10	10	0	100

A imunidade passiva nos pintos de galinhas vacinadas dura assim duas semanas e é absoluta até essa idade; em seguida decresce sùbitamente, para tornar-se nula nos pintos de 20 dias.

ON THE IMMUNITY OF CHICKS AND CHICK EMBRYOS FROM HENS VACCINATED AGAINST FOWL SPIROCHAETOSIS

Abstract

Immunity against fowl spirochaetosis can be detected in embryos developed in eggs laid only two weeks after the vaccination of the hens.

80% of the chicks hatched from eggs laid during the first week after vaccination are sensitive to the inoculation of spirochaetes gallinarum; on the other hand 80% of the chicks hatched from eggs laid from 10 to 16 days after the vaccination are resistant to the infection.

Chicks hatched from vaccination hens show absolute immunity to the disease during the first two weeks of age, when it suddenly decreases, disappearing completely at the age 20 days.

BIBLIOGRAFIA

1 — Kroó, H. — 1933 — Über Infektionsverlauf und Immunität bei neugeborenen und erwachsenen Tieren. *Klin. Woch.*, 40: 1573-1574.

2 — Kroó, H. — 1935 — Studien über Immunität und Chemotherapie bei neugeborenen und erwachsenen Tieren. *Zeit. f. Immunforsch.*, 84: 1-13.

3 — Kroó, H. e J. G. Orbaneja — 1935 — Über die ererbte Immunität bei der Hühnerspirochaetose. *Zeit f. Immunforsch.*, 86: 224-228.

4 — Levaditi, C. — 1906 — La spirillose des embryons de poulet dans ses rapports avec la tréponémose héréditaire de l'homme. *Ann. Inst. Part.*, 20: 924-938.

Vol. 16 — Art. 11 Novembro de 1945

ESTUDOS SÔBRE A DICOUMARINA - 3,3'-METILENO*BIS*-(4-HIDROXICOUMARINA)

II. EFEITO COAGULANTE DE VENENOS DOS GÊNEROS *BOTHROPS* E *CROTALUS* SÔBRE O PLASMA OXALATADO DE ANIMAIS NORMAIS E TRATADOS PELA DICOUMARINA

POR

M. Rocha e Silva & Sylvia O. Andrade

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Em trabalho anterior (13) descrevemos experiências preliminares com o produto hemorrágico 3,3' - metileno*bis* - (4 - hidroxicoumarina) — dicoumarina — obtido sinteticamente, em nosso laboratório, de acôrdo com a técnica de STAHMAN, HÜBNER e LINK (15). Em colaboração com P. BUENO (*) mostramos que extratos antitóxicos do fígado, dotados de acentuado poder protetor contra a ação hepatotóxica do tetraclorêto de carbono, não exercem ação inibidora sôbre o efeito anticoagulante da dicoumarina. Também a xantina sódica, dotada de poder antitóxico no que se refere à lesão hepática produzida pelo CCl_4 (11), não exerce efeito inibidor sôbre a ação da dicoumarina. Esses fatos mostram que o efeito antiprotrombinêmico da dicoumarina não depende de uma possivel lesão do parenquima hepático e consequente incapacidade do fígado de sintetizar a protrombina.

A dicoumarina parece agir, de certo modo, especificamente sôbre o mecanismo de síntese da protrombina pelo fígado. É preciso lembrar ainda que a dicoumarina não altera de maneira apreciavel o teôr de fibrinogênio, ou de cálcio, no plasma circulante, e é praticamente sem efeito sôbre o número de plaquetas do sangue periférico. Esses fatos justificam o uso da dicoumarina para a obtenção de um plasma pobre em protrombina e, portanto, como reativo precioso para o estudo do mecanismo da ação de substâncias tromboplásticas. Neste trabalho estudaremos comparativamente o comportamento de plasmas de animais normais e de animais tratados com a dicoumarina, em face dos agentes coagulantes presentes em venenos dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*.

O estudo do poder coagulante dos venenos de cobra dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* tem sido feito, desde fins do século passado, com

(*) Resultados não publicados.

técnicas imperfeitas, usando-se o sangue total *in vitro* e *in vivo*, como reativo quase preferencial. A pobreza de dados colhidos com tais métodos explica que só em 1937 o mecanismo da ação coagulante dos venenos desses gêneros de cobra tenha sido parcialmente esclarecido por EAGLE (2). Êste pesquisador usou técnicas finas e precisas para atacar o problema, tendo chegado à conclusão de que os venenos se podem classificar em dois grupos, de acôrdo com a sua atividade coagulante: 1.º) o dos que se comportam como a tripsina, agindo sôbre o mecanismo de transformação da protrombina em trombina; 2.º) o dos que se comportam como a papaina, catalisando a transformação direta do fibrinogênio em fibrina. Segundo EAGLE, o veneno de *Crotalus t. terrificus* pertenceria ao segundo grupo, isto é, teria a propriedade da papaina, de transformar diretamente o fibrinogênio em fibrina; ao passo que os venenos do gênero *Bothrops* agiriam por um mecanismo duplo, transformando diretamente a protrombina em trombina, podendo agir ainda sôbre soluções purificadas de fibrinogênio. Esses resultados foram confirmados por SLOTTA e cols. (14), em São Paulo.

De acôrdo com a concepção de EAGLE, a tripsina pode substituir o sistema tromboplastina - cálcio, para a transformação da protrombina em trombina. Essa afirmação tem sido objeto de críticas severas de outros investigadores. Desde o trabalho fundamental de MELLANBY (9) tinha ficado claro que a presença de iônios Ca^{++} acelera nitidamente o efeito coagulante da tripsina. Recentemente, FERGUSON e cols. (3) mostraram que não só a presença de iônios cálcio, mas também de tromboplastina, acelera notavelmente o efeito coagulante da tripsina cristalina. FERGUSON foi então levado à concepção de que a tripsina catalisa a formação de um complexo tromboplastina + cálcio + protrombina, com a posterior libertação de trombina ativa. Os fatos apresentados neste trabalho mostram que também a ação coagulante dos venenos de *Bothrops* e de *Crotalus* é acelerada pela presença de iônios cálcio e de tromboplastina. Êsse resultado foi observado com relativa facilidade e nitidez nos plasmas pobres de protrombina, colhidos de animais tratados previamente pela dicoumarina.

Um último ponto que merece ser mencionado nesta introdução é a questão de se poder usar o veneno de *Bothrops* como reativo de rotina para a determinação do teôr de protrombina do sangue humano, em substituição às preparações de tromboplastina universalmente

usadas para êsse fim. FULLERTON (4), recentemente, aconselhou o uso do veneno da víbora russélica, como substituto da suspensão de tromboplastina. Entre nós, HARGREAVES (6), preconizou o uso do veneno de *Bothrops jararaca*, para o mesmo fim. Como veremos a seguir, essa questão nos parece ainda pouco investigada, e os resultados por nós obtidos em ratos alimentados com a dicoumarina e nos quais o tempo da protrombina variou de 24" a 1 hora, mostraram antes que o veneno de *Bothrops* não pode substituir a suspensão de tromboplastina, na determinação quantitativa da protrombina.

MATERIAL E MÉTODOS

Embora as técnicas usadas neste trabalho venham referidas na literatura sôbre o assunto, daremos a seguir, de maneira sucinta, um esbôço delas, para facilitar a compreensão dos resultados experimentais apresentados.

Água fisiológica oxalatada: 1 cc da solução de oxalato de sódio M/10 foi adicionado a 19 cc de água fisiológica 0,9%.

Plasma oxalatado: O sangue era colhido por meio de seringa contendo a solução de oxalato de sódio M/10, na proporção de 1 volume da solução para 9 de sangue total. O sangue era, em seguida, centrifugado durante 20 a 30 minutos a 3.000 rotações por min. e o plasma, colhido por meio de pipetas afiladas, com bulbo de borracha. Nas experiências realizadas em ratos, 0,9 cc de sangue era colhido em seringas de 2 cc, contendo 0,1 cc da solução de oxalato de sódio M/10. Os ratos eram sangrados no coração depois de cuidadosa imobilização por meio de um bloco de madeira conformado à anatomia externa do animal. Essa perfeita e rápida imobilização tornou-se indispensável para reduzir a mortalidade dos ratos em consequência da punção cardíaca. Duas ou três sangrias no mesmo rato normal, em dias sucessivos, raramente produziam a morte do animal. Nos ratos tratados pela dicoumarina, entretanto, a tendência à hemorragia pela picada do coração limitava grandemente o êxito da operação. Os coelhos eram sangrados por punção cardíaca, e os cães por meio de punção da via jugular.

Solução de fibrinogênio: O plasma oxalatado de cão (cêrca de 20 cc em cada experiência) era precipitado pela adição de um terço do seu volume de uma solução saturada de sulfato de amôneo. O precipitado era colhido por centrifugação, redissolvido em água fisiológica oxalatada (volume inicial do plasma) e recentrifugado. O sobrenadante era colhido por decantação e reprecipitado pela adição de um terço do seu volume da solução saturada de sulfato de amôneo. O mesmo processo era repetido 2 ou 3 vêzes. O material precipitado pela última adição de sulfato de amôneo era colhido por centrifugação e redissolvido em um terço do volume original do plasma, em água fisiológica oxalatada. Ordinariamente as soluções de fibrinogênio assim obtidas são muito estáveis e não mais coagulam pela adição da mistura de tromboplastina + cálcio. Em alguns casos, no primeiro dia da preparação, uma coagulação lenta pode ser obtida pela simples adição de tromboplastina + cálcio, mas a mesma solução de fibrinogênio,

mantida na geladeira por 2 ou 3 dias, perde completamente a capacidade de coagular sem a adição de trombina já formada.

Suspensão de tromboplastina: Coelhos normais eram mortos por secção dos vasos do pescoço, depois de uma colheita de 30 a 40 cc de sangue por punção cardíaca. O cérebro era retirado e as meninges e vasos sanguíneos cuidadosamente removidos. A massa cerebral era então triturada sob acetona e esta última substituida, repetidamente, em poucas horas de intervalo, até completa secagem do material, que era então reduzido a pó homogêneo, mantido na geladeira. A suspensão de tromboplastina, para a experiência, era preparada agitando-se 100 mgs do material em 5 cc de água fisiológica. Depois de 15' de permanência a 56°, a suspensão era adicionada de 5 cc de solução 0,025 M de clorêto de cálcio. Em seguida o material era centrifugado, em baixa rotação, durante 5 minutos, para se removerem as partículas mais grosseiras. A suspensão leitosa era usada na determinação do tempo da protrombina, pelo método em um estágio, de QUICK (12). Para isso, 0,1 cc do plasma oxalatado era adicionado de 0,1 cc de água fisiológica, e o tempo cronometrado a partir do momento da adição de 0,2 cc da suspensão de tromboplastina + cálcio. Qualquer alteração desta técnica original será indicada no texto.

Administração da dicoumarina: A administração da dicoumarina era feita em coelhos, por via bucal, na dose de 40 a 50 mgs, em cápsulas de gelatina. Geralmente uma única dose da dicoumarina elevava de maneira suficiente o tempo da protrombina, depois de um periodo de latência de 24 a 48 horas. Quando tempos extremos eram desejados, a mesma dose era repetida uma ou duas vêzes, nos dias subsequentes. Diariamente o tempo da protrombina era determinado em amostras de sangue oxalatado, colhidas na veia da orelha. Quando o tempo da protrombina se mostrava satisfatoriamente aumentado, o animal era submetido a uma sangria de 25 a 40 cc de sangue, por punção cardíaca. Na maioria dos casos, depois da sangria, os animais tratados pela dicoumarina morriam ao fim de algumas horas, com abundantes hemorragias intrapericárdicas.

Determinação do poder proteolítico: Na determinação do poder proteolítico foi usado o micrométodo descrito por GRASSMANN e HEYDE (5) e que consiste em titular os grupos —COOH livres, em meio alcoólico a 90%. A hidrólise era realizada em frascos fechados, de 2,5 cc de capacidade, imersos em termostato a 39°. Amostras de 0,2 cc eram pipetadas ao fim de determinados intervalos de tempo e tituladas com uma solução M/100 de KOH, em 90% de álcool etílico, depois da adição de 1,8 cc de álcool absoluto. O indicador usado foi a timolftaleina.

RESULTADOS

Efeito dos venenos de *Bothrops e Crotalus* sôbre o plasma normal oxalatado de coelho — Em todas as experiências realizadas, o veneno de *B. atrox* mostrou-se mais ativo do que o de *B. jararaca* e extremamente mais ativo do que o de *C. t. terrificus*. A tabela 1 mostra, comparativamente, os efeitos dos três venenos estudados.

TABELA 1

Estudo comparativo dos efeitos coagulantes dos venenos de *B. jararaca*, *B. atrox* e *C. t. terrificus* sôbre o plasma normal oxalatado

Natureza do veneno:	Diluições dos venenos (sol. 1/1000)					
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/40
Bothrops jararaca	42"	55"	73"	117"	170"	407"
Bothrops atrox	12"	12"	15"	17"	24"	37"
Crotalus t. terrificus	102"	75"	84"	115"	174"	386"

Cada tubo contém 0,2 cc do plasma normal oxalatado de coelho, e o tempo foi cronometrado a partir do momento em que 0,2 cc da diluição do veneno foi adicionado.

Interessante é o fenômeno de zona observado com o veneno de *Crotalus t. terrificus* sôbre o plasma normal. Como pode ser visto na tabela 1, a diluição 1/1.000 produziu uma coagulação mais lenta que a diluição 1/2.000. Êsse efeito de zona, observado especialmente com o veneno de *C. t. terrificus*, depende provavelmente da demorada ação dêsse veneno sôbre o plasma normal. O mesmo efeito de zona foi observado quando eram usadas maiores concentrações do veneno de *B. atrox*. A concentração 1/500 agia mais lentamente do que a de 1/1.000. A explicação mais racional para êsse efeito de zona seria a de uma ação destruidora de altas concentrações do veneno sôbre os elementos indispensaveis à coagulação. Em algumas experiências, em que altas concentrações do veneno foram usadas, pôde-se observar uma redissolução quase instantânea do coágulo.

Ação proteolítica dos venenos de cobra sôbre a caseina e a benzoil-l.arginina-amida. Em vista das infindaveis discussões quanto à identidade dos fatores proteolíticos e coagulantes presentes nos venenos de cobra, procuramos verificar se havia paralelismo entre a ação coagulante e o poder proteolítico, medido pelo velocidade de aparecimento de grupos -COOH livres, pela hidrólise de soluções de caseina e do substrato sintético benzoil-l. arginina-amida, em pH compreendido entre 7 e 8. O método, de determinar o aumento de grupos -COOH livres, pareceu-nos mais exato do que outros (8, 16), em que se dosa o nitrogênio soluvel em ácido tricloracético a 5 %. Neste último caso, longas cadeias polipeptídicas podem aparecer em solução no ácido tricloracético, embora apenas alguns élos peptídicos tenham sido rompidos pela ação proteásica dos venenos de cobra. Isso explica o fato de obterem os autores

mencionados (8 e 16) uma rápida e completa solubilização da caseina pela ação da protease dos venenos de *Bothrops* e *Crotalus*. De acôrdo com os resultados referidos na tabela 2, a atividade proteolítica dêsses venenos é bastante reduzida. Usando 10 mgs de venenos de *B. atrox*, *B. jararaca* e *C. t. terrificus*, em 5 cc de agua fisiolófica, 1cc dêsses solutos digeriram, em 20 horas, aproximadamente as mesmas quantidades de caseina a 6 %, em pH 7,3.

TABELA 2

Poder proteolítico relativo dos venenos de *B. atrox*, *B. jararaca* e *C. t. terrificus*

Venenos:	Hidrólise da caseina		Hidrólise da benzoil-l. arginina-amida	
	2 horas	20 horas	2 horas	20 horas
Crotalus t. terrificus . . .	0,20	0,31	0,05	0,15
Crotalus t. terrificus . . .	0,20	0,41	0,05	0,15
Bothrops atrox	0,26	0,34	0,02	0,22
Bothrops atrox + cisteina . .	0,11	0,11	—	—
Bothrops jararaca	0,24	0,41	0,03	0,27
Bothrops jararaca	0,20	0,39	—	—

Cada frasco contém 1 cc da solução a 0,2% do veneno correspondente + 0,4 cc de mistura de fosfatos (pH 7,3) + 0,1 cc de água fisiológica + 1 cc da solução de caseina a 6%. A hidrólise da caseina é indicada em cc de solução N/100 de KOH. Nas experiências de hidrólise de benzoil-l. arginina amida, em vez da solução de caseina, era adicionado 1 cc de uma solução 1,25 mM de benzoil-l. arginina-amida (BAA).

Pelos resultados resumidos na tabela 2, pode-se ver que não houve diferença apreciavel na capacidade proteolítica dos 2 venenos experimentados. A cisteina inibiu parcialmente o veneno de *Bothrops atrox*. Como se pode ver, os três venenos são capazes de hidrolisar o substrato típico da tripsina, que é a benzoil-l. arginina-amida (1), o que mostra que todos contêm uma triptase, de acôrdo com a concepção de IRVING, FRUTON e BERGMANN (7).

Dadas as diferenças de ação coagulante dos três venenos estudados e a quase nenhuma diferença entre os seus poderes proteolíticos, não parece haver uma relação unívoca entre as capacidades proteolítica e coagulante dos venenos de *Bothrops* e *Crotalus*. Dada a importância dessa afirmação, entretanto, devemos admitir que uma conclusão definitiva deve aguardar experiências mais delicadas, com ma-

terial purificado, extraido dos venenos mencionados. Como provavelmente, a proteolíse constitúe apenas um dos degráus iniciais do complexo fenômeno da coagulação, é possivel que outros fatores contribúam para acelerar o efeito coagulante do veneno de *B. atrox*, em comparação com o do veneno de *C. t. terrificus*.

Efeito do cálcio sôbre a ação coagulante dos venenos de *Bothrops* — A adição da solução de $CaCl_2$ M/40 ao plasma oxalatado, determina uma ligeira aceleração do poder coagulante do veneno de B. *atrox*. Êste efeito adjuvante do cálcio pode ser evidenciado, mais nitidamente, de maneira indireta, pela sua completa remoção do plasma normal. Efetivamente a adição de doses crescentes de oxalato de sódio ao plasma de coelhos normais ou tratados pela dicoumarina, determina um nítido aumento dos tempos da coagulação produzida pela adição do veneno. As experiências da tabela 3 mostram que a adição de doses crescentes de 0 a 0,4 cc de uma solução M/5 de oxalato de sódio determina uma elevação dos tempos de coagulação pelo veneno, de 23" para 50".

Esses resultados estão de acôrdo com os dados recentemente publicados por HEARGRAVES (6), obtidos com o veneno de *Bothrops jararaca*.

TABELA 3

Efeito do cálcio sôbre a coagulação do plasma oxalatado de coelhos normais

I	II	III	IV	V	
H_2O fisiológica	Sol. $CaCl_2$ M/40	Sol. oxalato sódio M/5	Veneno *B. atrox* 1/1000	0,1 cc dos plasmas de coelhos normais	
				Coelho II	Coelho I
0,30	0,10	—	0,10	30"	—
0,30	0,10	—	0,10	31"	—
0,40	—	—	0,10	35"	23"
0,37	—	0,03	0,10	38"	32"
0,35	—	0,05	0,10	38"	—
0,30	—	0,10	0,10	45"	—
0,25	—	0,15	0,10	47"	—
0,20	—	0,20	0,10	50"	38"
—	—	0,40	0,10	—	48"
—	—	0,40	0,10	—	50"

A adição de doses crescentes de oxalato de sódio (coluna III) determina um nítido aumento dos tempos de coagulação do plasma normal de coelho (colunas V). Volume final em cada tubo 0,5 cc.

Influência do cálcio e da suspensão de tromboplastina na coagulação do plasma de coelho, pelos venenos de *B. atrox* e *B. jararaca* — Plasmas de coelhos tratados pela dicoumarina mostraram-se material muito apropriado ao estudo da ação adjuvante do complexo tromboplastina + cálcio, sôbre a ação coagulante dos venenos de *Bothrops*. Os plasmas dos coelhos tratados pela dicoumarina apresentam tempos de protrombina compreendidos entre 57" e 271", em contraste com os tempos de protrombina de coelhos normais que oscilam entre 10" e 15". É indispensavel salientar que seria dificil ou impossivel usar plasmas normais para testar a influência da adição de tromboplastina sôbre a ação coagulante do veneno de *B. atrox*. Como se vê na tabela 3, o veneno (sem tromboplastina) coagula plasmas normais de coelho em 23" a 30". Ora, a adição de tromboplastina + cálcio (sem veneno), coagula o plasma em 10" a 15". No caso dos plasmas-dicoumarina, os tempos de protrombina mostraram-se consideravelmente aumentados e superiores aos obtidos pela adição de venenos do gênero *Bothrops*. Uma ação aceleradora nítida pôde ser evidenciada nas numerosas experiências realizadas (tabelas 4 e 5).

TABELA 4

Influência do cálcio e da tromboplastina sôbre a coagulação de plasmas de coelhos tratados pela dicoumarina, em seguida à adição de veneno de *B. atrox*

H_2O fisiológica	Solução $CaCl_2$ M/40	Solução tromboplastina	Veneno *B. atrox* 0,1 cc da solução	0,1 cc de plasmas oxalatados de coelhos tratados pela dicoumarina			
				Coelho IV	Coelho V	Coelho VI	Coelho VII
0,1	0,1	0,1	—	57"	123"	271"	121"
0,2	—	—	1/2000	50"	52"	600"	53"
0,1	0,1	—	1/2000	40"	40"	—	—
—	0,1	0,1	1/2000	31"	40"	118"	35"
0,1	0,1	0,1	—	61"	126"	348"	125"
0,2	—	—	1/4000	39"	42"	125"	51"
0,1	0,1	—	1/4000	35"	40"	85"	43"
—	0,1	0,1	1/4000	20"	28"	62"	31"

Na tabela 4 a primeira e a quinta linhas horizontais indicam os tempos da protrombina determinados pelo método de QUICK, isto é, pela adição da mistura cálcio + tromboplastina, sem adição de veneno de *B. atrox*. A segunda e sexta linhas indicam os tempos de coagu-

lação, pela adição de veneno de *B. atrox*, nas concentrações 1/2.000 e 1/4.000 respectivamente, sem adição de tromboplastina e cálcio. Pode-se ver que a adição de $CaCl_2$ M/40 produziu uma ligeira aceleração da coagulação de todos os plasmas, sob a ação do veneno de *B. atrox* (linhas horizontais 3 e 7). A adição de tromboplastina + cálcio reduziu quase à metade os tempos de coagulação dos diversos plasmas sob a ação do veneno de *B. atrox*. Por experiências adicionais, chegamos à conclusão de que êsse efeito da mistura tromboplastina + cálcio sôbre o plasma-dicoumarina, deve incidir sôbre a transformação da protrombina em trombina e não sôbre a transformação do fibrinogênio em fibrina.

O mesmo efeito acelerador do cálcio e da mistura de tromboplastina e cálcio pode ser visto na tabela 5, que se refere à coagulação produzida pelo veneno de *B. jararaca*. As duas primeiras linhas horizontais representam os tempos da protrombina determinados pelo método de QUICK. A terceira e a quarta linhas representam os tempos de coagulação pela adição do veneno de *B. jararaca*. A adição de cálcio e da mistura de tromboplastina e cálcio determinou um efeito moderadamente ecelerador, no primeiro caso, e fortemente acelerador, no segundo.

TABELA 5

Influência do cálcio e da mistura tromboplastina + cálcio sôbre a coagulação de plasmas de coelhos tratados pela dicoumarina, em seguida à adição de veneno de *B. jararaca*

H_2O fisiológica	Solução $CaCl_2$ M/40	Mistura tromboplastina + cálcio	Veneno de *B. jararaca*	0,1 cc de plasmas dos coelhos	
				Dicoum. VIII	Dicoum. IX
—	—	0,2	—	227"	68"
—	—	0,2	—	222"	65"
0,2	—	—	1/2000	290"	68"
0,2	—	—	1/4000	316"	65"
0,1	0,1	—	1/2000	181"	143"
0,1	0,1	—	1/4000	267"	136"
—	—	0,2	1/2000	151"	40"
—	—	0,2	1/4000	76"	28"

Efeitos dos venenos de *B. atrox* e *B. jararaca* sôbre o plasma normal de cão e sôbre uma preparação purificada de fibrinogênio de cão — Pudemos confirmar os resultados descritos por EAGLE (2), de que

os venenos de Bothrops e de Crotalus agem diretamente sôbre uma preparação purificada de fibrinogênio. Soluções a 1/2000 dos venenos estudados coagularam, em 2 a 3 minutos, soluções de fibrinogênio de cão, 2 ou 3 vêzes concentradas. Interessante e dificil de explicar foi o pronunciado efeito intensificador da mistura tromboplastina cálcio sôbre a coagulação de soluções de fibrinogênio de cão, pelo veneno de Bothrops. Na tabela 6 estão indicados comparativamente os tempos de coagulação da solução de fibrinogênio de cão pelo veneno da B. atrox, sem ou com a adição de tromboplastina cálcio.

TABELA 6

Efeito do veneno de *B. atrox* sôbre solução purificada de fibrinogênio de cão

Material	Diluições do veneno de *B atrox:*			
	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000
Série A (sem tromboplastina)	180"	150"	240"	1800"
Série B (com tromboplastina e cálcio) . .	35"	52"	69"	157"

Cada tubo contém: série A: 0,1 cc da diluição do veneno + 0,2 cc de H_2O fisiológica + 0,1 cc de solução de fibrinogênio 3x concentrada; série B: 0,1 cc da diluição do veneno + 0,2 cc da mistura de tromboplastina e cálcio + 0,1 cc da solução de fibrinogênio.

Contrôle: 0,1 cc da solução de fibrinogênio + 0,2 cc da mistura tromboplastina e cálcio + 0,1 cc de H_2O fisiológica, não coagulou, mesmo ao fim de 24 horas, o que mostra que a solução de fibrinogênio usada era livre de protrombina.

Nas experiências seguintes (tabela 7), em que foram experimentados comparativamente os efeitos coagulantes dos venenos de B. atrox e B. jararaca sôbre uma solução purificada de fibrinogênio de cão, adicionamos sempre a mistura tromboplastina e cálcio, a qual determina uma coagulação mais pronta e um coágulo mais firme e bem formado.

A tabela 7 mostra que praticamente não há diferença entre os efeitos dos venenos de B. atrox e B. jararaca sôbre a solução de fibrinogênio adicionada de tromboplastina e cálcio, ao passo que o efeito do veneno de B. atrox é muitas vezes mais intenso do que o de B. jararaca, quando se usa o plasma total de cão. Êsse resultado indica que os componentes dos venenos citados, responsaveis pela coagulação do plasma total, de um lado, e de soluções purificadas

de fibrinogênio, de outro, são provavelmente distintos. O veneno de Crotalus t. terrificus, entretanto, mostrou-se nitidamente menos ativo do que os de Bothrops, sôbre soluções purificadas de fibrinogênio, como indica a tabela 8.

TABELA 7

Comparação entre os efeitos dos venenos le *B. atrox* e *B. jararaca* sôbre solução de fibrinogênio 2x concentrada

Natureza das experiências	Diluições dos venenos				
	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16000
Série A (Ven. *B. atrox* + plasma normal)	23"	23"	24"	25"	30"
Série B (Ven. *B. jararaca* + plasma normal)	40"	60"	75"	92"	—
Série C (Ven. *B. atrox* + solução fibrinogênio)	25"	23"	46"	76"	115"
Série D (Ven. *B. jararaca* + solução fibrinogênio)	24"	29"	56"	84"	—

Cada tubo contém: série A: 0,1 cc da diluição do veneno de *B. atrox* + 0,1 cc de plasma oxalatado de cão + 0,2 cc de H_2O fisiológica; série B: 0,1 cc da diluição do veneno de *B. jararaca* + 0,1 cc de plasma normal oxalatado + 0,2 cc de H_2O fisiológica; série C: 0,1 cc da diluição do veneno *B. atrox* + 0,1 cc da solução de fibrinogênio + 0,2 cc da solução de tromboplastina e cálcio; série D; 0,1 cc da diluição do veneno de *B. jararaca* + 0,1 cc da solução de fibrinogênio + 0,2 cc da mistura tromboplastina e cálcio. Em todos os casos o veneno era adicionado em último lugar e o tempo cronometrado a partir dêsse momento.

TABELA 8

Estudo comparativo dos efeitos dos venenos de *B. atrox* e de *C. t. terrificus* sôbre solução purificada de fibrinogênio

Material	Diluições dos venenos					
	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16000	1/40000
Série A (Ven. de *C. t. terrificus*)	85"	121"	215"	300"	480"	720"
Série B (Ven. *B. atrox*) . . .	27"	37"	55"	80"	101"	180"

Cada tubo contém: série A: 0,1 cc das diluições do veneno de *C. t. terrificus* + 0,2 cc da mistura de tromboplastina e cálcio + 0,1 cc da solução de fibrinogênio; série B: 0,1 cc das diluições de veneno de *B. atrox* + 0,2 cc da mistura de tromboplastina e cálcio + 0,1 cc da solução de fibrinogênio.

TABELA 9

Ativação do efeito coagulante da papaina pela adição de cisteina

Diluições de Papaina	Tempos de coagulação em minutos			
	Papaina		Papaina - cisteina	
	Série A (H_2O fisiológica)	Série B (Tromb. Ca)	Série C (H_2O fisiológica)	Série D (Tromb. Ca)
1/2	4 1/2'	2 1/2'	—	45"
1/4	21'	40'	2 1/2'	45"
1/8	50'	∞	3'	1'
1/16	∞	∞	10 1/2'	7'
1/32	∞	∞	20'	9'
1/64	∞	∞	∞	20'

Solução de papaina tamponada: 5 cc da solução-mãe de papaina (8 mgs por 1 cc) + 2 cc de mistura de fosfato (pH 7,4) + 3 cc de H_2O fisiológica. Solução de papaina - cisteina: 2 cc da solução acima + 1 cc da solução de cisteina (concentração final 0,04 mM por 1 cc) + 1 cc de H_2O fisiológica. Série A: cada tubo contém: 0,1 cc das diluições de papaina tamponada + 0,1 cc da solução de fibrinogênio + 0,2 cc de H_2O fisiológica. Série B: cada tubo contém: os mesmos reagentes, com a substituição da água fisiológica pela mistura tromboplastina e cálcio. Série C: cada tubo contém: 0,1 cc das diluições de papaina-cisteina + 0,2 cc de H_2O fisiológica + 0,1 cc da solução de fibrinogênio. Série D: cada tubo contém: mesmos reagentes com a substituição da água fisiológica pela mistura tromboplastina e cálcio.

Efeito coagulante da papaina-cisteina sôbre soluções purificadas de fibrinogênio — O efeito da mistura tromboplastina e cálcio sôbre a coagulação do fibrinogênio pelo veneno de cobra não está de acôrdo com a idéia esquemática de que a mistura tromboplastina e cálcio age exclusivamente na primeira fase do processo da coagulação, isto é, na transformação da protrombina em trombina. Também o efeito da papaina sôbre soluções purificadas de fibrinogênio é fortemente acelerada pela adição da mistura tromboplastina e cálcio ao sistema. Pelas nossas experiências com soluções de papaina (pH 7,2 a 7,4) os seguintes fatos tornaram-se bem patentes: 1°) a preparação de papaina purificada catalisa a transformação de fibringênio em fibrina muito mais rapidamente quando adicionada de uma solução de cisteina; 2.°) a papaina, tratada com uma quantidade apropriada de oxalato de sódio, produz abundante precipitado e não mais coagula o plasma normal de coelho; 3.o) a

mistura tromboplastina e cálcio acelera consideravelmente a transformação do fibrinogênio em fibrina, sob a ação da papaina-cisteina. Os fatos 1 e 3 estão indicados na tabela 9. Dificil é explicar porque a papaina-cisteina não coagula o plasma normal, porquanto êste último contém fibrinogênio. Talvez a concentração de fibrinogênio do plasma normal seja pequena, permitindo sua destruição massiça sob a ação da papaina-cisteina. Êste fato, entretanto, merece ser pesquisado mais demoradamente. Outro ponto curioso que não poderia ser explicado pelos esquemas habituais é o fato de não ser a papaina-cisteina, embora dotada de atividade proteolítica semelhante à da tripsina (presença de uma triptase, como mostraram IRVING, FRUTON e BERGMANN (7), capaz de transformar diretamente a protrombina em trombina, como o faz a tripsina cristalina. Duas possibilidades poderiam explicar êsse fato: 1.º) que a atividade proteolítica desses enzimas não seja responsavel pela ação coagulante, o que é muito improvavel; 2.º) que a cisteina adicionada, como ativador, à papaina, exerça um efeito inibidor sôbre a protrombina, antes da sua transformação em trombina. Esta última explicação parece-nos mais razoavel, dada a verificada capacidade da cisteína de inibir a coagulação normal do sangue, como foi verificado por MUELLER e STURGIS (10) e outros.

Correlação entre os tempos da protrombina medidos com a técnica de QUICK e os tempos de coagulação do plasma, pela adição de veneno de *B. atrox* — As experiências indicadas na tabela 10 foram realizadas com um lote de ratos que receberam dicoumarina pela bôca. Os tempos de coagulação obtidos pela adição de veneno de *B. atrox* aos plasmas oxalatados foram geralmente menores do que os medidos pela técnica de QUICK e não parece haver qualquer correlação entre os tempos da protrombina e os de coagulação pelo veneno de *B. atrox*. Êsses resultados mostram ser prematura a conclusão de HEARGRAVES (1944), de que o veneno de *Bothrops* possa ser usado em determinações de tempo de protrombina, na rotina corrente do laboratório clínico. Êsse resultado, evidentemente, deveria ser esperado, dada a complexidade do mecanismo coagulante dos venenos do gênero *Bothrops*. Fazendo-se sentir o efeito do veneno não só sôbre a transformação da protrombina em trombina, como também sôbre a coagulação de soluções purificadas de fibrinogênio, não seria de esperar que o seu efeito fosse comparavel ao da mistura tromboplastina e cálcio, usada nos métodos correntes de determinação da protrom-

bina. O valor do método de QUICK reside no fato de que o efeito da suspensão de tromboplastina e cálcio depende de uma única variavel, que é o teôr de protrombina do plasma.

TABELA 10

Correlação entre os tempos de protrombina medidos com a técnica de QUICK e os tempos de coagulação pela adição de veneno de *B. atrox*

Plasmas de 11 ratos normais e 18 tratados com a dicoumarina	Tempos de coagulação em segundos	
	Pela adição de tromboplastina + cálcio (médias)	Pela adição de solução 1/2000 de ven. *B. atrox* (médias)
I. Plasmas normais (11)	25 1/2"	24 2/3"
II. Plasmas de ratos tratados pela dicoumarina (tempos ligeiramente elevados) (8)	29"	24 1/2"
III. Plasmas de ratos tratados (tempos medianamente elevados) (3)	61"	32 1/2"
IV. Plasmas de ratos tratados (tempos muito elevados) (6)	203"	59"
V. Plasmas de ratos tratados (tempo excessivamente elevado) (1)	3.600"	70"

Nas experiências referidas nesta tabela foram usados plasmas oxalatados de ratos normais e de ratos tratados com a dicoumarina. Os algarismos entre parêntesis indicam o número de determinações, cuja média é indicada na tabela.

CONCLUSÕES

O estudo comparativo dos efeitos coagulantes dos venenos de *Bothrops atrox, B. jararaca e Crotalus t. terrificus* mostrou ser o primeiro extremamente mais ativo do que o último, enquanto o segundo apresenta uma atividade intermediária. Nessas experiências foram utilizados os venenos em natureza. Pequenas diferenças na ação proteolítica dêsses venenos sôbre a caseina e a benzoil-l. arginina-amida não poderiam explicar tão acentuadas diferenças nos efeitos coagulantes observados.

A adição de solução de $CaCl_2$ M/40 ao plasma oxalatado determina ligeira aceleração da coagulação produzida pelo veneno de *B. atrox*. Ao contrário, a adição de quantidades crescentes de oxalato de sódio M/5, produz consideravel retardamento do efeito coagulante do mesmo veneno, em virtude da remoção mais completa de cálcio do sistema. Êsse efeito acelerador do cálcio sôbre a coagulação produzida pelo veneno de *B. atrox* está de acôrdo com os resultados descritos por HEARGRAVES (6).

Em plasmas colhidos de coelhos, prèviamente tratados pela dicoumarina, foi possivel evidenciar também consideravel efeito acelerador da mistura tromboplastina e cálcio, sôbre o efeito coagulante dos venenos de *B. atrox* e *B. jararaca*. Dificilmente êsse efeito poderia ser observado sem o uso da dicoumarina. Efetivamente, a mistura tromboplastina e cálcio coagula o plasma normal oxalatado em tempos muito mais curtos do que os venenos usados. Nos animais tratados pela dicoumarina, entretanto, pode-se observar nítida dissociação entre os efeitos da mistura tromboplastina e cálcio e do veneno, produzindo, êste último, coagulação em tempo relativamente curto, enquanto que os tempos da protrombina se mostram com valores relativamente elevados ou mesmo infinitos. Êste fato, que foi verificado mais extensamente em numerosos plasmas de ratos normais ou tratados pela dicoumarina, mostra ser prematura a afirmação, feita por HEARGRAVES (6), de que os venenos de *Bothrops* podem ser usados para medir os tempos da protrombina, na rotina dos laboratórios clínicos.

Também sôbre soluções purificadas de fibrinogênio, a mistura tromboplastina e cálcio acelera consideravelmente o efeito coagulante dos venenos de *Bothrops atrox* e *Crotalus t. terrificus*. A mesma relação de atividade entre os três venenos estudados, como foi mencionado para o plasma total oxalatado, parece ser mantida, no que se refere a ação sôbre soluções purificadas de fibrinogênio, sendo o veneno de *B. atrox* mais ativo do que o de *B. jararaca*, e êste último mais do que o de *Crotalus t. terrificus*.

Realizamos experiências, usando a papaina como agente coagulante, e chegamos aos seguintes resultados: 1.°) soluções de papaina purificada transformam soluções purificadas de fibrinogênio em fibrina, muito mais rapidamente quando em contacto com a cisteina; 2.°) a papaina exerce ação coagulante sôbre o plasma normal em virtude da presença de quantidades apreciaveis de sais de cálcio nas preparações, mesmo purificadas, de papaina; a precipitação dêstes últimos, pela adição de oxalato, anula totalmente a ação coagulante da papaina sôbre o plasma normal oxalatado; 3.°) a mistura tromboplastina e cálcio acelera de maneira apreciavel a conversão do fibrinogênio em fibrina, sob a ação da papaina-cisteina.

Numa série de plasmas de ratos normais e ratos tratados pela dicoumarina, os tempos de protrombina foram determinados, de acôrdo com a técnica de QUICK, pela adição da mistura tromboplastina e cálcio; simultaneamente eram feitas determinações dos tempos de coagulação, pela adição de solução 1/2000 do veneno de *B. atrox*. A

correlação entre os valores obtidos pelos dois métodos foi imperfeita e em muitos casos foi observada completa falta de paralelismo entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Êsse fato, por si só, restringe ou anula completamente a possibilidade do uso dos venenos do gênero *Bothrops* para determinações de rotina, dos tempos da protrombina.

Discussão dos fatos acima mencionados pode ser encontrada no texto, em cada um dos parágrafos correspondentes.

STUDIES ON DICOUMARIN — 3,3'-METHYLENE*BIS*-(4-HYDROXYCOUMARIN). II. COAGULANT EFFECT OF SNAKE VENOMS (FROM "BOTHROPS" AND "CROTALUS") UPON OXALATED PLASMAS FROM NORMAL AND DICOUMARIN TREATED ANIMALS.

Abstract

This paper deals with experiments upon the clotting effect produced by venoms from Bothrops atrox, B. jararaca and Crotalus t. terrificus on plasmas from normal and dicoumarin treated animals.

The effect of calcium was studied not only by adding increasing amounts of a M/40 solution of calcium chloride, but also by adding an excess of sodium oxalate. The addition of an excess of calcium did significantly accelerate coagulation produced by the venom of B. atrox, while an excess of oxalate definitely increased clotting time by this venom.

In dicoumarin treated plasmas, the addition of a mixture of thromboplastin + calcium simultaneously with the proper amount of the venoms of B. atrox, B. jararaca and C. t. terrificus, produced considerable decrease in the time of coagulation. Also, upon purified preparations of fibrinogen the mixture of thromboplastin + calcium produced a considerable accelerating effect upon the coagulation by the venoms of B. atrox and C. t. terrificus.

Experiments were made using papain as clotting agent. We have shown that cysteïn enhances the clotting effect of papain upon purified preparations of fibrinogen; that the addition of sodium oxalate entirely prevented the clotting effect of papain upon normal plasma and that the mixture of thromboplastin + calcium accelerates conversion of fibrinogen to fibrin by papain-cysteïn.

The possibility of using venoms from Bothrops as a substitute for the mixture of thromboplastin + calcium in the labo-

ratory routine for determination of prothrombin time, induced us to make a comparative study of the effects of the mixture of thromboplastin + calcium, according to the method of Quick, and of the venom of Bothrops atrox. We have used the plasmas of about 30 rats, 11 of which were normal and 19 were given dicoumarin orally. No definite correlation was observed between the results obtained by the two methods, this constituting a serious objection against the use of the venom from Bothrops in routine determinations of prothrombin time.

BIBLIOGRAFIA

1 — Bergmann, M. and J. S. Fruton — 1941 — The specificity of proteinases. In: *Advances in Enzymology* 1: 63-98. Intersc. Publ. Inc., New York.

2 — Eagle, H. — 1937 — The coagulation of blood by snake venoms and its physiologic significance. *Journ. Exp. Med.*, 65: 613-639.

3 — Ferguson, J. H. and B. N. Erickson — 1939 — The coagulant action of crystalline trypsin, cephalin and lung extracts. *Amer. Journ. Physiol.*, 126: 661 667.

4 — Fullerton, H. W. — 1940 — Estimation of prothrombin; a simplified method. *Lancet* 2: 195-196.

5 — Grassmann, W. und W. Heyde — 1929 — Alkalimetrische Mikrobestimung der Aminosaeuren und Peptide. *Zeitsch. Physiol. Chem.*, 183: 32-38.

6 — Hargreaves, A. B. — 1944 — Estudos sôbre a coagulação do plasma pelo veneno de jararaca (Bothrops jararaca) em mistura com o cálcio; seu mecanismo de ação. *Rev. Bras. Biol.*, 4: 367-527.

7 — Irving, G. W. Jr., J. S. Fruton and M. Bergmann — 1942 — The activation of papain tryptase as a function of the nature of the activator. *Journ. Gen. Physiol.* 25: 669-677.

8 — Iyengar, N. K., K. B. Sehra and B. Mukerji — 1938 — Studies on protease of cobra venom. *Indian Journ. Med. Res.*, 26: 487-492.

9 — Mellanby, J. — 1930 — Prothrombase; its preparation and properties. *Proc. Royal Soc. B.*, 107: 271-285.

10 — Mueller, J. H. and S. Sturgis — 1932 — Prevention of blood coagulation by cysteine. *Science*, 75: 140.

11 — Neale, R. C. and H. C. Winter — 1938 — Identification of active crystalline substance from liver which protects against liver damage due to chloroform or carbon tetrachloride. *Journ. Pharm. Exp. Ther.*, 62: 127-148.

12 — Quick, A. J. — 1936 — On coagulation defect in peptone shock; consideration of anti-thrombins. *Amer. Journ. Physiol.*, 116: 535-542.

13 — Rocha e Silva, M. — 1943 — Estudos sôbre a Dicoumarina - 3, 3' - metileno-*bis* - (4. hidroxicoumarina). I. Histórico e experiências preliminares. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 14: 293-309.

14 — Slotta, C. H., G. Szyska e H. L. Fraenkel-Conrat — 1937 — Estudos sôbre os venenos ofídicos. III. Teor de coagulação e da lecitinase. *Mem. Inst. Butantan*, 11: 133-147.

15 — STAHMANN, M. A., C. F. HUEBNER and K. P. LINK — 1941 — Studies on hemorrhagic sweet clover disease. V. Identification and synthesis of the hemorrhagic agent. *Journ. Biol. Chem.*, 138: 513-527.

16 — TABORDA, L. C. — 1940 — A influência da temperatura sôbre os princípios tóxico, coagulante e proteolítico do veneno de Bothrops jararaca. *Mem. Inst. Butantan*, 14: 167-180.

Vol. 16 — Art. 12 Novembro de 1945

ESTUDOS SÔBRE A TRANSMISSÃO DA DOENÇA DE VIRUS DE SOLANÁCEAS "NECROSE DAS NERVURAS", POR AFÍDIOS, E ALGUMAS RELAÇÕES ENTRE ESSE VIRUS E O SEU PRINCIPAL INSETO-VETOR

POR

A. Orlando e K. Silberschmidt

Do Instituto Biologico de S. Paulo

I — INTRODUÇÃO

NOBREGA e SILBERSCHMIDT tentaram, em um trabalho anterior (12,1944), identificar o virus encontrado em um tubérculo de uma variedade peruana de batatinha, chamada "Serrana Negra". Chegaram os autores do referido trabalho à conclusão de que o virus em questão pertence ao grupo do virus "Y" da batatinha (Solanum virus 2. Orton.), mas que representa uma variante distinta, possuindo a peculiaridade de provocar necroses em plantas de algumas variedades de fumo. Devido ao carater dos sintomas em fumo, a doença causada por esse virus foi chamada pelos referidos autores "Necrose das Nervuras". Já havia na literatura algumas indicações acerca de variantes necróticas do virus "Y" da batatinha, que no citado trabalho foram comparadas com o virus da "Necrose das Nervuras", sem que se tivesse verificado a identidade absoluta de uma única destas variantes com o virus da doença óra em estudo. No trabalho de NOBREGA e SILBERSCHMIDT (12, 1944) é feita referência a alguns ensáios em que foi conseguida por meio dos afídios *Myzus persicae* SULZ. e *Macrosiphum solanifolii* ASHM., a transmissão do virus em questão a partir de plantas infeccionadas para plantas sadias de fumo da variedade "White Burley".

Já que a primeira verificação do virus causador da "Necrose das Nervuras" foi feita em batatinha, achamos necessário ainda averiguar se esse virus tambem pode ser transmitido, por afídios, à planta hospedeira em que originalmente havia sido constatado. Com este fim executamos algumas séries de ensáios visando a transmissão da doença de fumo para batata, de batata para fumo e de batata para batata.

No decurso desses ensáios chamou a nossa atenção a grande nitidez com que, nestas experiências de transmissão por afídios, os sintomas da "Necrose das Nervuras" se apresentam nas plantas in-

feccionadas, especialmente nas de fumo. Resolvemos então aproveitar esta peculiaridade para executar alguns experimentos complementares, em que visamos esclarecer certas relações de carater mais geral entre esse virus e o seu principal inseto vetor.

Entre as questões que procuramos abordar nestes ensáios, mencionamos aqui, especialmente, o problema da duração da atividade do virus no corpo do inseto, e o do número mínimo de afídios necessário para conseguir resultados positivos de transmissão. Além disso, tivemos também a oportunidade de fazer algumas observações sôbre a maneira intermitente em que esse virus, ás vezes, é transmitido para séries consecutivas de plantas hospedeiras.

Sôbre cada um desses problemas, embora acerca de outros virus, já existe vasta literatura, à qual nos referiremos, pelo menos rapidamente, por ocasião da discussão dos resultados por nós obtidos.

Na apresentação dos nossos dados, que faremos nos capítulos seguintes, vamos relatar primeiramente as experiências em que incluimos plantas de batatinha para o estudo da transmissão do virus "Necrose das Nervuras" por afídios. Exporemos depois, em capítulos separados, os ensáios que dedicamos ao esclarecimento das referidas relações entre o virus e o vetor.

Este último grupo de ensáios foi exclusivamente executado com o principal vetor desse virus, isto é, o afídio *Myzus persicae*, e em plantas de "*White Burley*", variedade de fumo que, justamente, mostra os sintomas da "Necrose das Nervuras" com grande nitidez.

À apresentação dos nossos dados precede um capítulo, em que explicamos os principais métodos empregados nesse estudo, e o carater de nosso material.

Agradecemos ao Snr. NELSON R. NOBREGA, assistente da Seção de Fisiologia Vegetal deste Departamento, o fornecimento das primeiras plantas infeccionadas necessárias para o início deste trabalho. Ao Snr. PAULO CORRÊA, auxiliar de laboratório, da mesma Seção, os nossos agradecimentos pela colaboração prestada na execução desses estudos.

II — TÉCNICA

Resumimos neste parágrafo as descrições de ordem mais geral, relativas à técnica empregada no conjunto das experiências aqui referidas, reservando a explicação de detalhes adicionais ou de exceções, para o início de cada capítulo correspondente.

Faremos primeiramente referência às duas espécies de afídios, (*Myzus persicae* SULZ. e *Macrosiphum solanifolii* ASHM.) utilizadas no

presente estudo, que foram sempre criadas antes do emprego em qualquer das experiências aqui descritas, em plantas determinadas como não suscetíveis a esse virus.

As plantas não suscetíveis aqui empregadas são as mesmas referidas pelos autores deste trabalho em "O Biológico" (14,1944), sendo somente introduzida aqui uma variação referente ao afídio *Macrosiphum solanifolii* ASHM., que para tais estudos foi criado em uma Curcubitacea não determinada.

Esse tipo de criação, que chamaremos "criação de estoque", foi utilizado com o fim de obter insetos livres do virus em estudo. Toda criação foi, antes de qualquer série de experimentação, testada quanto à ausência de contaminações. Fizemos essa verificação transferindo diretamente 60 a 80 afídios daí retirados, para duas plantas novas de fumo da var. *"White Burley"*, já determinada por NOBREGA e SILBERSCHMIDT (12,1944) como sendo bastante sensivel à infecção por aquele virus.

Os afídios, considerados assim isentos do virus em estudo, foram então transferidos para as plantas doentes (Fócos), a fim de adquirirem o virus.

Essa operação, foi realizada, nesses estudos, por dois meios, quando se tratava, respetivamente, dos fócos "fumo", ou "batatinha".

Para o primeiro caso, a técnica empregada foi semelhante à já descrita por WATSON (20,1936), AINSWORTH and OGILVIE (1,1939), KASSANIS (9,1942) e também já referida por nós (10,1945), na qual os afídios foram submetidos a um jejum de 3-4 horas, antes de lhes ser permitido alimentarem-se, por 30 minutos, em fôlhas de fumo doentes.

Quando porém plantas de batatinha doentes serviram de alimento para os afídios, procurou-se conseguir a colonização natural desses insetos nessas plantas, num tempo que variou de 8 a 12 dias, sendo tais experiências realizadas em grandes caixas protegidas por téla metálica.

Os afídios, assim tornados presumivelmente infectivos, foram transferidos, em ambos os casos, para as plantinhas sadias, por meio de um pincel de pêlo de camelo.

Em todas as experiencias, as plantas de fumo sadias, utilizadas, pertencentes sempre à var. *"White Burley"*, eram ainda muito novas: de cerca de 2 meses e meio e possuindo 3-4 fôlhas.

Mais dificil foi a obtenção de plantas garantidamente sadias nos ensáios realizados com plantas de batatinha oriundas de tubér-

culos. Para essas experiências, de um número relativamente grande de plantas cultivadas em vasos, escolhemos as que não apresentavam sintomas de doenças de virus e que ainda, por testes de inoculação mecânica, executados em plantas indicadoras, provaram ser isentas de virus. Os resultados dessas experiências executadas com batatinhas das variedades "Eigenheimer" e "Bintje", acham-se reunidas nas tabelas 1 e 2 sob o título "Prova de sanidade".

Além disso pudemos também realizar diversos ensáios com batatinhas cultivadas a partir de sementes verdadeiras da variedade boliviana, chamada "Saccampaya". O material desta variedade foi-nos gentilmente cedido pelo Prof. M. CÁRDENAS, Reitor da Universidade Autônoma "Simon Bolívar" em Cochabamba (Bolivia). Devido à pequena frequência com que é observada, de acordo com as indicações da literatura, a transmissão de doenças de virus por sementes, pudemos dispensar, nestes últimos ensáios, os cuidados antes descritos.

As plantas de batatinha sadias foram infestadas por afídios presumivelmente infectivos, quando tinham cerca de 15 dias as de Eigenheimer e Bintje, e de 40 dias as de Saccampaya.

Sempre que os afídios foram transferidos para as plantas sadias, estas foram protegidas por pequena manga de vidro, a fim de evitar infestações extranhas. Nestas plantas permaneceram os afídios durante 10 dias, no máximo. Depois desse prazo as plantas sadias foram pulverizadas ou fumigadas com sulfato de nicotina a 0,1%, sendo então mantidas em ambiente à prova de insetos.

Aproximadamente 2 mêses depois da infestação pelos afídios, dos pés de batata assim tratados retiramos algumas fôlhas, cujo suco inoculamos novamente em plantas de fumo da variedade "White Burley".

Consideramos assim casos positivos de transmissão por afídios só as plantas de batata, cujos sucos produziram em fumo os sintomas típicos da doença em estudo. Essa operação complementar, por nós chamada "Prova de transmissão", e incluida também nas tabelas 1 e 3, foi necessaria porque as plantas de batata não reagem à infecção pelo virus de maneira tão característica e constante como as de fumo da variedade "White Burley".

III — ENSAIOS RELATIVOS À INCLUSÃO DE BATATINHA ENTRE AS PLANTAS INFECCIONADAS POR AFÍDIOS, COM O VIRUS DA "NECROSE DAS NERVURAS"

O fim das experiências cujos resultados estão resumidos neste parágrafo, consistiu em apurar com maior segurança a transmissibi-

lidade do virus da "Necrose das Nervuras" por afídios. Serviram de fóco de infecção, na primeira parte dos ensáios aqui relatados, plantas doentes de *Nicotiana tabacum*, ao passo que nas séries subsequentes a transmissão foi efetuada a partir de plantas de batatinha infeccionadas. Nos dois grupos de experiências procuramos infeccionar com o virus plantas de batatinha e de fumo, sadias.

A — TRANSMISSÃO DA DOENÇA A PARTIR DE FUMO DA VAR. "WHITE BURLEY" PARA PLANTAS SADIAS DA MESMA ESPÉCIE E PARA DIFERENTES VARIEDADES DE BATATINHA

Nas primeiras experiências, realizadas em 27/7/44, tentamos obter a colonização dos afídios nas plantas de fumo doentes da var. "White Burley". Com esse fim, em 27/7/44 foram colocados em uma dessas plantas 380 afídios *Myzus persicae* SULZ. Esses afídios ai permaneceram durante 8 dias. Depois desse prazo sómente foram encontrados 48 afídios, que ao serem transferidos para duas plantas de fumo, sadias e pertencentes à mesma variedade, provocaram um caso positivo de transmissão, conforme vemos:

planta N.º WB 267 — 8 afídios — Negativo até 25/8/1944
planta N.º WB 266 — 30 afídios — Positivo em 12/8/1944

Nóva tentativa nesse sentido foi realizada em 24/8/1944 com uma planta da var. "Withe Burley" com sintomas típicos da doença e ainda em melhores condições que a precedente, por ser a planta mais nóva. Nesse dia a referida planta de fumo, da variedade "White Burley", foi infestada com cerca de 300 afídios *Myzus persicae* SULZ., que aí permaneceram de 24/8 a 28/8/1944. Em 28/8/44 foi tentada a transferência dos afídios para as plantas sadias. Entretanto, apenas se encontraram 33 deles, que foram transferidos para a planta "White Burley" 279, que em 11/9/44 apresentou os sintomas da doença em estudo.

Esses exemplos indicam que o processo de transmissão, em que se provoca a colonização dos afídios, pôde ser aqui empregado, a partir de planta de fumo doente, pertencente à var. "White Burley", com resultados positivos. Esses resultados mostram, entretanto, que a colonização dos afídios em plantas de fumo é assaz precária, devido ao grande número de mortes e à falta de multiplicação. SMITH (17, 1929) já se referira a esse fato, considerando como sua causa a existência, nas plantas de fumo, de inúmeros tricomas que excretam uma substância viscosa, que tolhendo e dificultando a movimentação dos insetos nas fôlhas, ocasiona a morte deles.

Esse fato póde aliás ser observado na natureza, pois plantas de fumo nunca têm afídios em abundância. É preciso ainda frizar

TABELA 1

Resultados de transmissão da doença "Necrose das nervuras" por afídios, (com jejum), a partir de fumo da var. "White Burley" para plantas de batatas sadias de diferentes variedades.

Afídios	Variedade de batatinha	Plantio	Origem da planta	Prova de sanidade			Número de afídios por planta	Prova de transmissão			
				Data da realização	Resultado			Data da realização	Resultado		
					N.º de plantas testadas	N.º de plantas doentes			N.º de plantas testadas	N.º de plantas doentes	% de transmissão
Myzus persicae SULZ.	Bintje	7/10/44	Tubérculo	10/10/44	8	0	50-100	10/1/45	8	3	37,5
	Eigenheimer	11/10/44	Tubérculo	24/10/44	6	0	50-80	30/1/45	6	5	83,3
	Saccampaya	21/10/44	Semente verdadeira	17/11/44	8	0	15-20	20/1/45	8	5	62,5
	Saccampaya	30/1/45	Semente verdadeira	7/3/45	16	0	15-20	16/5/45 e 22/5/45	15	10	66,6
Macrosiphum solanifolii ASHM.	Saccampaya	30/1/45	Semente verdadeira	7/3/45	30	0	15-20	16/5/45 e 22/5/45	23	9	39,13

que, das duas espécies de afídios testados (*Myzus persicae* SULZ. e *Macrosiphum solanifolii* ASHM.) e que são encontradas espontaneamente em plantas de fumo, a primeira que foi submetida a essas provas preliminares, se comporta melhor quanto à alimentação e multiplicação.

Diante da alta porcentagem de perdas naqueles ensáios preliminares, resolvemos adotar, em todas as experiências subsequentes, a técnica de jejum, quando utilizamos plantas de fumo como fóco.

Os resultados conseguidos pela transmissão da doença a partir de fumo, para plantas da mesma espécie, já foram relatados na citada publicação de NOBREGA e SILBERSCHMIDT (12, 1944).

A tabela I do presente trabalho mostra os resultados complementares, obtidos pela transmissão da doença a partir do mesmo fóco para plantas de batata sadias, de diferentes variedades, e com o emprego dos afídios já citados.

Esses novos resultados vêm confirmar os referidos no trabalho de NOBREGA e SILBERSCHMIDT (12, 1944), indicando, ainda mais uma vêz, que ambos os afídios testados são, com efeito, vetores da doença em estudo, e que *Myzus persicae* SULZ. deve ser apontado, entre ambos, como o transmissor de maior eficiência.

Dos resultados da mesma tabela podemos alem disso inferir que *Myzus persicae* transmitiu a doença de fumo para batatinha com menor eficiência do que de fumo para esta mesma espécie. Este resultado merece ser destacado, porque, como já expuzemos, é justamente sôbre batatinha que o afídio coloniza com maior facilidade.

Quanto ao afídio *Macrosiphum solanifolii*, que também coloniza mais intensamente em plantas de batata do que em fumo, esse difere do outro vetor por transmitir, de fato, a doença "Necrose das nervuras" em maior porcentagem para batatinha do que para fumo.

B — TRANSMISSÃO DA DOENÇA A PARTIR DE PLANTAS DE BATATA, PARA FUMO E PLANTAS DA MESMA ESPÉCIE

Em continuação dessas experiências de transmissão propriamente dita, realizamos novos ensáios, nos quais utilizamos plantas de batatinha como fócos, transmitindo a doença, por afídios, a partir dessas plantas, para fumo e batatinha de diferentes variedades. Neste grupo de ensáios tornou-se possivel colonizar os afídios nas plantas doentes a fim de torna-los infectivos, sem entretanto submete-los a um jejum, antes de os transferir às plantas sadias,

Os resultados obtidos nesses ensáios encontram-se reunidos nas tabelas 2 e 3.

TABELA 2

Resultados de transmissão da doença "Necrose das nervuras" por afídios, colonizados em plantas de batata, doentes, da var. Eigenheimer, e transferidos para plantas sadias de fumo, da var. W. Burley

Afídios	N.º de afídios por planta	N.º de plantas de fumo testado	N.º de plantas de fumo doente	% de transmissão	Testemunhas	Testemunhas doentes
Myzus persicae SULZ.	30-40	8	7	87,5	4	0
Macrosiphum solanifolii ASHM.		8	4	50,0	4	0

O conjunto desses resultados confirma as nossas observações anteriores quanto à transmissibilidade da doença por afídios.

Também nas experiências resumidas nas tabelas 2 e 3, o afídio *Myzus persicae* SULZ., se comportou como vetor de maior eficiência.

Comparando esses resultados com os da tabela 1, verificamos que a porcentagem de transmissão com ambos os vetores não é sensivelmente alterada pelo emprego da técnica de colonização direta dos afídios nas plantas doentes.

Podemos ainda concluir desses resultados, que nas experiências de transmissão efetuadas com o afídio *Myzus persicae* sempre se consegue menor porcentagem de casos positivos, se incluimos batatinhas na experimentação. Pelo contrário, o afídio *Macrosiphum solanifolii* ASHM. transmitiu a doença em maior número de casos, se a planta a ser inoculada, ou o fóco, não pertençam à espécie de *Nicotiana tabacum*.

IV — ALGUMAS RELAÇÕES ENTRE O VIRUS DA "NECROSE DAS NERVURAS" E O INSETO VETOR *MYZUS PERSICAE* SULZ.

De acordo com os resultados apresentados em o item III deste trabalho, verificamos que o virus em estudo demonstrou ser de relativamente facil transmissão por insétos, conseguindo-se resultados bastante concordes, principalmente com o afídio *Myzus persicae* SULZ.

A relativa facilidade de transmissão deste virus, junto com a nitidez dos sintomas por ele provocados, fez-nos julgar interessante aproveitar essas peculiaridades para investigar algumas relações entre esse virus e o seu principal inseto vetor. Com outros virus o estudo da tais relações oferece, muitas vezes, grandes dificuldades.

TABELA 3

Resultados de transmissão da doença "Necrose das nervuras" por afídios, colonizados em plantas de batatinha, doentes, da variedade Eigenheimer, e transferidos para plantas sadias de batata de diferentes variedades.

Afídios	Variedade de batatinha	Plantio	Origem da planta	Prova de sanidade			Número de afídios por planta	Prova de transmissão			
				Data da realização	Resultado			Data da realização	Resultado		
					N.º de plantas testadas	N.º de plantas doentes			N.º de plantas testadas	N.º de plantas doentes	% de transmissão
Myzus persicae SULZ.	Eigenheimer	20/11/44	Tubérculo	12/12/44	3	0	50-80	16/2/45	2	2	100,00
	Saccampaya	30/1/45	Semente verdadeira	26/2/45	25	0	15-20	16/5/45	23	12	52,11
Macrosiphum solanifolii ASHM.	Eigenheimer	20/11/44	Tubérculo	12/12/44	3	0	50-80	16/2/45	3	2	66,66
	Saccampaya	30/1/45	Semente verdadeira	26/2/45	13	0	15-20	22/5/45	13	4	30,77

A — EXPERIÊNCIAS PARA DETERMINAÇÃO DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO E DOS LIMITES DA INFETIVIDADE DO VIRUS EM ESTUDO EM RELAÇÃO AO VETÔR *MYZUS PERSICAE* SULZ.

Essas experiências foram realizadas tendo como fonte de virus fôlhas doentes, de plantas de fumo da variedade "White Burley", pertencendo a essa mesma variedade as plantas sadias testadas.

Os afídios, depois de um jejum de 3-4 horas, foram alimentados, em fôlhas destacadas e doentes, por um perìodo máximo de 15 minutos. Decorrido esse tempo, os afídios, em número de 30, foram transferidos para a primeira planta sadia, onde também permaneceram, alimentando-se, durante 15 minutos, sendo em seguida realizada nova transferência para uma segunda planta de "White Burley" sadia, onde também permaneceram por 15 minutos, e assim sucessivamente.

Essas operações foram executadas, de maneira idêntica, em cada uma das experiências indicadas na tabela 4.

Interpretando os resultados apresentados na Tabela 4, verificamos, em primeiro lugar, que a perda de afídios por desaparecimento ou morte, nas sucessivas transferências, foi sempre muito pequena, não ultrapassando de 16, 67% do número original, o que torna aqueles dados comparáveis entre si.

As experiências resumidas na tabela 4 mostram que o "período de incubação" do virus no inseto vetor é relativamente pequeno, pois na totalidade dos casos experimentados, já a primeira planta de "White Burley" sadia testada, adquiriu a doença em estudo. Esse comportamento em relação à transmissão indica que o afídio *Myzus persicae* SULZ. já consegue transmitir a virus num prazo não superior a 30 minutos. Assim sendo, devemos admitir que o "período de incubação" do virus da "Necrose das nervuras" no vetor não ultrapassa o limitado prazo de 30 minutos.

Esses resultados são perfeitamente comparáveis com os conseguidos por HEINZE e KÖHLER (7,1940), OSBORN (15,1937), WATSON (23,1940), que verificaram, para outros virus transmitidos por afídios, "períodos de incubação" extremamente curtos. Por outro lado, talvez seja interessante lembrar o caso da doença "enrolamento" da batatinha (Solanum virus 14. APPEL e QUANJER), cujo virus, embora transmissivel por afídios tem, conforme estudos realizados por SMITH (19,1931) e ELZE (4,1927), um "período de incubação" de cerca de 54 horas.

A tabela 4 também mostra que a "perda de infetividade" pelos insétos é relativamente rápida, pois nas condições dessa experiência o afídio nunca conseguiu transmitir o virus para alem da 4.ª planta oferecida, o que corresponde a um prazo máximo de 1 hora.

Devemos porém frizar que nem sempre a eficiência do vetôr, nos ensáios sucessivos de transmissão, era contínua, pois em alguns

TABELA 4

Resultados de transmissão da doença "Necrose das Nervuras" por meio do afídio *Myzus persicae*, em ensáios para determinação do período de incubação e do limite de infetividade

Número da experiência	Enumeração das plantas de fumo testadas	Número de afídios	Resultados de transmissão	Número da experiência	Enumeração das plantas de fumo testadas	Número de afídios	Resultados de transmissão
1	1	30	+	2	5	30	+
	2	30	+		6	30	—
	3	28	+		7	30	+
	4	27	+		8	26	—
	Test.	—	—		Test.	—	—
3	9	30	+	4	13	30	+
	10	26	—		14	30	+
	11	25	—		15	30	—
	12	25	—		16	28	—
	Test.	—	—		Test.	—	—
5	17	30	+	6	22	30	+
	18	30	+		23	30	+
	19	28	+		24	29	—
	20	28	—		25	29	—
	21	28	—		26	29	—
	Test.	—	—		Test.	—	—
7	27	30	+	8	32	30	+
	28	30	—		33	27	+
	29	25	+		34	26	+
	30	25	—		35	26	+
	31	25	—		36	26	—
	Test.	—	—		Test.	—	—

Número da experiência	Enumeração das plantas de fumo testadas	Número de afídios	Resultados de transmissão
9	37	30	+
	38	29	+
	39	26	—
	40	25	—
	41	25	—
	Test.	—	—

casos observamos uma transmissão intermitente. Queremos expôr mais detalhadamente este caso, que é bastante elucidativo para a compreensão das relações existentes entre virus e vetor. Verificamos, por

exemplo, considerando as experiências 2 e 7 da nossa tabela que em ambos os casos os afídios transmitiram o virus sómente para as primeiras e terceiras plantas testadas, deixando de transmiti-lo às segundas.

Parece assim, que em certos casos os afídios podem perder durante algum tempo o poder de infetividade, para recupera-lo porém um pouco mais tarde. Achamos que a ocorrência dessa interrupção no processo da transmissão oferece certas dificuldades para uma explicação puramente mecânica do papel de alguns vetores, o qual, segundo tal suposição, seria o mesmo que o de qualquer objeto contaminado externamente com virus. A nosso ver, o modo de transmissão por nós observado se enquadra mais facilmente em uma teoria em que certos movimentos ou atos de inseto são considerados necessários para que se dê uma transmissão do virus.

B — EXPERIÊNCIAS PARA DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MÍNIMO DE AFÍDIOS *MYZUS PERSICAE* SULZ. NECESSÁRIO PARA TRANSMISSÃO DO VIRUS EM ESTUDO

Ainda com o fim de esclarecer qual o papel do inseto na transmissão do virus da doença "Necrose das nervuras", procuramos averiguar quantos afídios são necessários para provocar, numa planta sadia de "White Burley", uma infecção positiva.

TABELA 5

Resultados obtidos em ensáios para a determinação do número mínimo de afídios necessários para transmissão do virus da "Necrose das Nervuras"

Número de afídios	Número de plantas sadias testadas	Número de plantas doentes	Porcentagem de transmissão	Testemunhas	Testemunhas doentes
1	8	2	25,00	4	0
3	8	3	37,50	4	0
5	8	3	37,50	4	0
10	8	5	62,50	4	0
15	8	5	62,50	4	0
20	8	8	100,00	4	0
30	8	8	100,00	4	0

As nossas experiências a esse respeito foram realizadas com técnica semelhante à descrita na parte geral, sendo utilizadas plantas doentes e sadias, de fumo "White Burley".

Os resultados conseguidos acham-se reunidos em a tabela 5.

Por essa tabela verificamos que o virus em estudo pode ser transmitido, ainda que em baixa porcentagem, por 1 exemplar apenas, do afídio *Myzus persicae* SULZ.

Pode-se acrescentar aqui, de passagem, que a possibilidade da transmissão de doenças de virus por um só individuo, pertencente ao grupo dos afídios, já foi verificado por diversos autores, quanto a outras doenças de virus. Assim por exemplo OSBORN (15,1937) conseguiu resultados positivos de transmissão com um único exemplar de afídio com relação ao "pea-virus 2" (Phaseolus virus 2. PIERCE), ao passo que por WATSON (21,1939) foi averiguado um comportamento idêntico, relativamente ao "Hy. virus III". HAMILTON.

A nossa tabela ainda mostra que a porcentagem de transmissão, de um modo geral, cresce com o aumento do número de insetos, alcançando o máximo já com o número relativamente pequeno de 20 afídios.

WATSON (20,1936) considera, em seus estudos, que a razão da porcentagem mais reduzida de casos de transmissão obtida quando se emprega menor número de insetos, deve ser atribuida antes a uma menor probabilidade de aquisição de virus, do que à introdução de doses insuficientes.

Os resultados a que chegamos, citados de modo detalhado na tabela 5, vem confirmar, ao que nos parece, a dedução de WATSON, (20,1936) pois provam também, que com efeito, já um único afídio pode encerrar dose suficiente de virus para efetuar a transmissão da doença, desde que se trate de um indivíduo realmente virulífero.

C — EXPERIÊNCIAS RELATIVAS AO EFEITO DO JEJUM E DO TEMPO DE ALIMENTAÇÃO EM PLANTAS DOENTES, NA EFICIÊNCIA DE TRANSMISSÃO DO VIRUS, PELO AFÍDIO *MYZUS PERSICAE* SULZ.

Já que a questão de ser a maneira de transmissão deste virus puramente mecânica ou não, oferece um interesse especial, procuramos nos aproximar deste problema ainda de um outro ponto de vista.

Tentamos pois esclarecer se os insetos, que antes de alimentar-se em fôlhas doentes foram submetidos a um jejum, transmitem o virus com maior facilidade do que os indivíduos da mesma espécie que não sofreram este tratamento. E' óbvio que uma eventual diferença entre os dois grupos de vetores invalidaria a explicação puramente mecânica.

Essas experiências foram realizadas com técnica semelhante à já descrita na parte geral, empregando-se plantas de fumo doentes e sadias da variedade "White Burley". A única diferença na técnica entre estes ensáios e as experiências anteriores consiste no emprego, aqui, de plantas sadias ainda mais novas, isto é, de um mês e meio de idade.

Um grupo de afídios foi submetido a um jejum de 3-4 horas antes de ser alimentado em fôlhas de fumo com sintomas de doença em estudo, sendo outro grupo transferido às fôlhas doentes sem jejum prévio.

Os afídios colocados nas fôlhas doentes eram em número não superior a 5, critério usado com o fim de controlar perfeitamente o tempo de alimentação desejado.

Esse tempo de alimentação, que variou para ambos os grupos de 2-5 e 30 minutos, foi determinado com o auxílio de uma lente de bolso (2X), sendo usados então apenas os afídios que permaneceram durante o tempo previsto, com o rostrum em posição de alimentação, e desprezados os demais. Os afídios assim escolhidos foram transferidos individualmente para as plantas sadias de fumo da var. "White Burley".

Os resultados conseguidos acham-se representados em a tabela 6.

TABELA 6

Resultados obtidos na transmissão do virus da doença "Necrose das Nervuras" por um único afídio *Myzus persicae* SULZ. submetido ou não a jejum.

Número de afídios utilizados — 1 —										
	Com jejum de 3-4 horas					Sem jejum				
Tempo de alimentação em fôlhas doentes	Número de plantas testadas	Número de plantas doentes	% de transmissão	Testemunhas	Testemunhas doentes	Número de plantas testadas	Número de plantas doentes	% de transmissão	Testemunhas	Testemunhas doentes
2-5 minutos	12	4	33,3	6	0	10	0	0	5	0
30 minutos	15	6	40,0	8	0	12	4	33,3	6	0

Esses resultados confirmam os apresentados na tabela 5 na parte referente à transmissão da doença por um só afídio.

Esta tabela ainda mostra que a eficiência de transmissão está intimamente ligada ao jejum prévio dos afídios e ao tempo de alimentação em fôlhas doentes. Assim, os afídios submetidos a jejum conseguem transmitir o virus, mesmo quando se alimentam nas fôlhas doentes apenas pelo prazo de dois a cinco minutos, o que não acontece com os indivíduos não submetidos a jejum. Entretanto, verificamos ainda que quando o tempo de alimentação em fôlhas doentes cresce para trinta minutos, os afídios de ambos os grupos, isto é, submetidos ou não a jejum, conseguem transmitir o virus em porcentagens equivalentes.

DISCUSSÃO

No trabalho sôbre a doença "Necrose das Nervuras" publicado por NOBREGA e SILBERSCHMIDT (12, 1944), esse virus foi classificado como pertencente ao grupo do virus "Y" da batatinha.

Diante do grande número de autores que chegaram a resultados concordantes em estudos de transmissão de virus pertencentes

a este grupo, por insetos, não achamos necessário ressaltar nesta discussão a transmissibilidade da variante por nós pesquisada do virus "Y" (Solanum virus 2. ORTON) pelos afídios *M. persicae* e *M. solanifolii*, especialmente porque esses dois vetores são os mesmos já determinados, por vários autores, como sendo responsáveis pela disseminação do virus "Y" padrão da batatinha. Deixamos, por isso, de citar aqui todos os trabalhos que tratam apenas da transmissibilidade do virus "Y" da batatinha ou das suas variantes, por afídios.

Preferimos aqui expor, de maneira um pouco mais extensa, alguns problemas referentes à relação existente entre virus e vetor.

Nessa discussão procuraremos esclarecer até que ponto essas relações, examinadas por nós com o virus da doença "Necrose das Nervuras", concordam com as estabelecidas em trabalhos de outros autores e para outros virus.

A-fim-de não nos perdermos demasiadamente em detalhes, vamos comparar os resultados a que chegamos, exclusivamente com os obtidos com tipos de virus igualmente transmissíveis por afídios, deixando dest'arte de lado todos os virus propagados por outros grupos de insetos.

Como primeiro problema, que nos parece merecer uma especial consideração, queremos abordar aqui a questão do número máximo de plantas que os afídios conseguem infectar, uma vêz tornados virulíferos.

Conforme expuzemos à página 142, para a doença por nós pesquisada, o vetor *M. persicae*, depois da alimentação em plantas doentes, consegue transmitir esse virus, dentro do prazo de uma hora, a uma série sucessiva de quatro plantas de fumo, sadias.

Em nenhum caso foram obtidos resultados positivos de transmissão, por esse mesmo afídio, na quinta planta sucessiva testada.

Comparando esse resultado com algumas indicações da literatura referentes a outros virus, pode-se logo averiguar que o virus por nós estudado difere, neste particular, nitidamente do virus do pepino (Cucumis virus 1. DOOLITTLE). Conforme observações obtidas por DOOLITTLE e WALKER (3, 1928), o "mosaico do pepino", transmitido nesse caso por *Aphis gossypii* GLOV. só pôde ser passado à planta sadia que recebeu afídios imediatamente após a alimentação em plantas doentes.

Esses resultados foram mais tarde confirmados por experimentos executados por CELINO (2, 1940) sôbre o "mosaico do Abacá" e por OCFEMIA e colaboradores (13, 1942) sôbre o "mosaico da Canna

indica", doenças também causadas por virus pertencentes ao grupo do virus do "mosaico do pepino".

Se existe, déssa maneira uma nítida diferença entre o virus por nós estudado e o do "mosaico do pepino", o virus causador da "Necrose das Nervuras" se assemelha, neste particular, mais com o virus do "enrolamento" da batatinha (Solanum virus 14. APPEL e QUANJER).

Em experiências realizadas por SMITH (19, 1931), foram obtidas transferências sucessivas do virus do "enrolamento" da batatinha pelo vetor *M. persicae* a 6, 7 e até 10 plantas sadias, sem que os afídios nesse intervalo tivessem tido acésso às fontes.

Um comportamento bem comparavel com o do virus da "Necrose das nervuras" é demonstrado também pelos virus Hy. III. HAMILTON, "Y" das batatinhas e "severe etch" do fumo, segundo as experiências de WATSON e ROBERTS (22, 1940).

Nestas experiências, cada um desses tres virus pôde ser transmitido a uma série de 9 plantas sadias consecutivas, quando o processo total de transmissão se efetuou dentro de um prazo relativamente curto.

WATSON e ROBERTS (22, 1940) consideram os virus por eles estudados no referido trabalho como pertencentes ao grupo dos virus "não persistentes".

Baseados em nossas experiências podemos pois concluir que o virus da "Necrose das Nervuras" se comporta, neste particular, de maneira muito semelhante aos virus estudados por WATSON e ROBERTS (22, 1940), devendo pertencer ao mesmo grupo dos virus "não persistentes".

O problema por nós abordado acha-se muito estritamente ligado a uma outra questão, isto é, à da duração do prazo de atividade do virus no corpo do vetor.

E' facilmente compreensivel que o número de plantas consecutivas que os afídios virulíferos podem infectar, não representa uma medida perfeitamente exata da duração da atividade do virus no corpo do vetor, uma vêz que pode variar com a velocidade de transferência para novas plantas sadias. Por essa razão torna-se também necessário averiguar qual é o prazo máximo dentro do qual os afídios, tornados virulíferos, podem ainda transmitir o virus para as plantas sadias.

No caso do agente causador da doença "Necrose das Nervuras" verificamos que o virus permanece ativo no corpo do vetor *M. per-*

sicae durante o prazo de uma hora (pag. 142). Neste particular o virus da "Necrose das Nervuras" ocupa, portanto, uma posição intermediária entre os casos extremos, como são representados pelo "etch virus" do fumo (Nicotiana virus 7. E. M. JOHNSON.) e o "Yellow spot" do salsão.

Em experiências executadas por KASSANIS (8, 1941) foi verificado que *M. persicae* e algumas outras espécies de afídios, após se terem tornadas virulíferas, perderam, já após uma alimentação de 15 minutos sôbre uma planta sadia, o poder de infectar plantas sadias com o "etch virus" do fumo. Por outro lado, foi demonstrado por FREITAG e SEVERIN (6, 1939) que o afídio *Rhopalosiphum melliferum* HOTTES, após se tornar infectivo, conserva o virus de "Yellow spot" do salsão durante 12 dias. Dentro desses extremos, encontram-se na literatura referências a muitos virus, cuja longevidade no corpo do vetor ocupa lugares intermediários.

Parece que uma atividade mais prolongada no corpo do vetor do que a do virus por nós estudado, distingue o virus de "sugar beet yellow" estudado por WATSON (23, 1940) e o do "enrolamento" da batatinha, estudado por SMITH (18, 1929) e ELZE (5, 1931). Por outro lado, o virus do "mosaico do pepino", pesquisado por DOOLITTLE e WALKER (3, 1928) e mais tarde por OCFEMIA e colaboradores (13, 1942) se caracteriza por uma duração ativa no corpo do vetor bem semelhante à encontrada por nós para o virus da "Necrose das Nervuras".

Justamente por essa razão, é interessante frizar, mais uma vêz, que mesmo assim o virus do "mosaico do pepino" só pode ser transmitido a uma única planta suscetivel, ao passo que o virus por nós estudado podia ser passado para uma série de quatro plantas sadias consecutivas.

Outro aspéto da relação entre o virus da "Necrose das Nervuras" e o vetor *M. persicae*, que queremos destacar nesta discussão, é o relativo às interrupções temporárias de transmissão, observadas quando os afídios virulíferos são sucessivamente transferidos para uma série de plantas sadias, conforme nossa referência, à pagina 144. Observações análogas tem sido também constatadas para outros virus, que são transmitidos por afídios.

Assim, SMITH (19, 1931) verificou, ao transmitir o virus do "enrolamento" da batatinha para uma série sucessiva de plantas, falhas de transmissão em plantas intermediárias. WATSON e ROBERTS (22, 1940) e KASSANIS (8, 1941), trabalhando respetivamente

com os virus Hy. III, "Y" da batatinha e "*severe etch*" e "*tobacco etch virus*", constataram que a transmissão destes virus pelo vetor *M. persicae*, em alguns casos não se processa de maneira contínua.

Em nossos ensáios, de acordo com a indicação dada na tabela 4, observamos também alguns casos de interrupção temporária na transmissão; assim, as segundas plantas de duas séries experimentais (2 e 7), permaneceram sadias, enquanto as primeiras e terceiras plantas dessas mesmas séries adquiriram a doença em estudo.

Consideramos interessante ressaltar aqui, mais uma vêz, esses resultados, porque eles podem de algum modo servir, como já mencionamos à pag. 144, de indício de que, mui provavelmente, o virus da "Necrose das Nervuras", assim como numerosos outros virus ("Y", da batatinha, Hy. III, virus do "enrolamento" da batatinha e do "*etch*" do fumo) não são transmitidos de maneira simplesmente mecânica pelo afídio *M. persicae*, mas que deve haver entre virus e vetor, nestes casos, uma relação mais especificada, cuja exata determinação depende de futuras observações. Talvez o virus por nós pesquisado, e que se carateriza por sintomas bastante severos na variedade "White Burley" de fumo, possa ser utilizado com vantagem em estudos dessa natureza.

STUDIES ON THE TRANSMISSION BY APHIDS OF "NECROSE DAS NERVURAS", A VIRUS DISEASE OF SOLANACEAE AND ON SOME RELATIONS BETWEEN THIS VIRUS AND ITS PRINCIPAL INSECT-VECTOR

Abstract

1) The virus harbored in a tuber of the Peruvian potato variety "Serrana Negra" and considered by Nobrega and Silberschmidt (12, 1944) as a strain of the group of the potato-virus "Y", which induces very severe necrotic symptoms of a disease named "Necrose das Nervuras" on tobacco plants of the variety "White Burley", was transmitted in the present study by the aphids Myzus persicae Sulz. and Macrosiphum solanifolii Ashm., from tobacco to potato, (table 1, pg. 138) from potato to tobacco (table 2, pg. 140) and from potato to potato (table 3, pg. 141).

2) The healthy potato plants, included in these transmission experiments by aphids, derived either from true seeds (in the case of the plants of the Bolivian variety "Saccampaya") or from tubers (in the case of the plants of the cultivated varieties Bintje and Eigenheimer). The plants of this last group were previously proved to be free from virus infection.

3) The distinctive features of the symptoms, which the causal agent of the disease "Necrose das Nervuras" produces on tobacco plants of the variety "White Burley", encouraged us to study some relations between this virus and its principal insect vector Myzus persicae.

4) Thus we verified (table 4, pg. 143), that the incubation period of the virus in the insect is rather short (less than 30 minutes) and that the aphids, after becoming viruliferous and being transferred every quarter of an hour to a new healthy tobacco plant, succeeded in transmitting the virus at most to four successive plants. Under these experimental conditions the virus remained active in the body of the insect for a period not longer than one hour.

5) In the course of these experiments, which consisted in the transfer of the viruliferous aphids to 4 successive tobacco plants, we sometimes observed an intermittent type of transmission. For instance, the first and the third plant became infected, whereas the second plant did not acquire the disease (table 4, pg. 143). We admit, in accordance with other authors, that this interruption of the transmission offers certain difficulties in relation to the theory of a merely mechanical transmission of virus by aphids.

6) In other experiments we observed, that already one single viruliferous aphis is able to transmit the disease. Using as few as 20 aphids, the disease could be induced in the total number of tested plants (table 5, pg. 144).

7) The fasting of the aphids, previous to their feeding on the source of virus, proved to be an essential requisite for the success of the transmission only in cases of an extremely short (2-5 minutes) feeding period (table 6, pg. 146).

8) In the discussion we compare the behavior of the virus studied in this paper in relation to its principal insect vector with that of many other viruses, transmitted by aphids and referred to in the literature.

BIBLIOGRAFIA

1 — AINSWORTH, G. C. and L. OGILVIE — 1939 — Lettuce mosaic. *Ann. Appl. Biol.*, **26**: 279-297.

2 — CELINO, M. S. — 1940 — Experimental transmission of the mosaic of Abacá, or Manila Hemp plant (Musa textilis Née) *Philipp. Agric.*, 29: 379-403.

3 — DOOLITTLE, S. P. and W. N. WALKER — 1928 — Aphis transmission of Cucumber mosaic. *Phytopath.*, 18: 143.

4 — ELZE, D. L. — 1927 — De verspreiding van virusziekten van de aardappel (Solanum tuberosum L.) door insekten. *Inst. voor Phytopath., Lab. voor Mycol. en Aardappelonderzoek*, Meded. 32. Referência em *R. A. M.* 7: 48-50, 1928.

5 — ELZE, D. L. — 1931 — The relation between insect and virus as shown in potato leafroll, and a classification of viroses based on the relation. *Phytopath.*, 21: 675-686.

6 — FREITAG, J. H. and H. H. P. SEVERIN — 1939 — Additional Celery viroses. *Phytopath.*, 29: 824.

7 — HEINZE. K. und E. KÖHLER — 1940 — Die Mosaikkrankheit der Sojabohne und ihre Übertragung durch Insekten. *Phytopath. Z.*, 13: 207-242. Referência em *R. A. M.*, 20: 444-445, 1941.

8 — KASSANIS, B. — 1941 — Transmission of tobacco etch viruses by aphids. *Ann. Appl. Biol.*, 28: 238-243.

9 — KASSANIS, B. — 1942 — Transmission of potato virus "Y" by Aphis rhamni (Boyer). *Ann. Appl. Biol.*, 29: 95.

10 — KRAMER, M., A. ORLANDO e K. M. SILBERSCHMIDT — 1945 — Estudos sôbre uma grave doença de virus, responsavel pelo deperecimento de nossas culturas de alface. *O Biológico*, S. Paulo, 11: 121-134.

11 — LARSON, R. H. and J. C. WALKER — 1939 — A mosaic disease of Cabbage. *J. Agric. Res.*, 59: 367-392.

12 — NOBREGA, N. R. e K. SILBERSCHMIDT — 1944 — Sôbre uma provavel variante do virus "Y" da batatinha (Solanum virus 2, Orton) que tem a peculiaridade de provocar necroses em plantas de fumo. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 15: 307-330.

13 — OCFEMIA, G. O. ET. AL. — 1942 — Experimental transmission of the mosaic of Canna indica. *Philipp. Agric.*, 30: 357-370.

14 — ORLANDO, A. e K. M. SILBERSCHMIDT — 1944 — Estudos sôbre a transmissão do virus "Y" das batatinhas por afídios. *O Biológico*, S. Paulo, 10: 269.

15 — OSBORN, H. T. — 1937 — Studies on the transmission of Pea virus 2 by aphids. *Phytopath.*, 27: 589-603.

16 — ROBERTS, F. M. — 1940 — Studies on the feeding methods and penetration rates of Myzus persicae SULZ., Myzus circumflexus BUCKT. and Macrosiphum gei KOCH. *Ann. Appl. Biol.*, 27: 348-358.

17 — SMITH, K. M. — 1929 — Studies on potato virus diseases. IV. Further experiments with potato mosaic. *Ann. Appl. Biol.*, 16: 1-33.

18 — SMITH, K. M. — 1929 — Studies on potato virus diseases. V. Insect transmission of potato leafroll. *Ann. Appl. Biol.*, 16: 209-229.

19 — SMITH, K. M. — 1931 — Studies on potato virus diseases. IX. Some further experiments on insect transmission of potato leafroll. *Ann. Appl. Biol.*, 18: 141-157.

20 — WATSON, M. A. — 1936 — Factors affecting the amount of infection obtained by aphis transmission of the virus Hy. III. *Philos. Trans. Roy. Soc.*, Ser. B, 236: 458-489. Referência em *R. A. M.* 16: 332-333, 1937.

21 — WATSON, M. A. and F. M. ROBERTS — 1939 — A comparative study of the transmission of Hyoscyamus virus III, Potato virus "Y" and Cucumber virus 1 by the vectors M. persicae (SULZ.), M. circumflexus (BUCKT.) and Macrosiphum gei (KOCH.). *Proc. Roy.* Ser. B. 127: 543-576.

22 — WATSON, M. A. and F. M. ROBERTS — 1940 — Evidence against the hypothesis that certain viruses are transmitted mechanically by aphids. *Ann. Appl. Biol.*, 27: 227-233.

23 — WATSON, M. A. — 1940 — Studies on the transmission of Sugar beet yellows virus by the aphis, Myzus persicae (SULZ.). *Proc. Roy. Soc.*, Ser. B. 128: 535-552.

Vol. 16 — Art. 13 Novembro de 1945

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DA ESPÉCIE TIPO DE "MACROCHELES LATR." ("ACARINA"): "M. MUSCAEDOMESTICAE (SCOPOLI, 1772)" EMEND.

POR

C. Pereira e M. P. de Castro

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 22 figuras no texto

INTRODUÇÃO

No decorrer de estudos ecológicos sobre a mosca doméstica, tivemos a oportunidade de notar que, nas esterqueiras onde elas se criam, seus ovos são destruidos em escala muito apreciavel por ácaros pertencentes à família *Macrochelidae* VITZTHUM, 1930.

Como verificassemos a ocorrência de várias espécies entremeiadas, nos seus diferentes estádios evolutivos, impoz-se desde logo a caracterização de cada uma em particular, afim-de se tornar possivel a respectiva determinação.

Foi quando desenvolvemos a técnica de PEREIRA e CASTRO (1945), que nos permitiu criar os ácaros a partir de fêmeas, isoladas em câmaras individuais, alimentadas com ovos de mosca doméstica. Assim, pudemos relacionar com segurança os diversos estádios de cada espécie, de ovo a adulto, bem como estudar a variabilidade das peculiaridades morfológicas susceptiveis de adquirir importância, do ponto de vista taxonômico.

Infelizmente, si o estudo do material foi decorrendo em condições satisfatórias, o mesmo não aconteceu com as tentativas para classificá-lo, pois o número de espécies subia a cerca de uma dezena, muitas vezes com caracteres diferenciais muito discretos, ao passo que a literatura sobre o assunto revelava-se fertil em deficiências informativas, discordante nos critérios taxonômicos e particularmente confusa quanto à nomenclatura.

Depois de cerca de três anos de investigações conseguimos achar o fio da meada, que pensamos ter-nos permitido identificar com segurança a espécie objeto deste trabalho, que felizmente se revelou o tipo do gênero *Macrocheles* LATREILLE, 1829, o que torna maior ainda o interesse pelo seu conhecimento. Durante esse lapso de tempo, foi ela encontrada com frequência viajando sobre a mosca doméstica; no decorrer desse período de observação não se registrou praticamente a ocorrência de outro representante do gênero nesse hospedeiro, embora

houvesse cerca de uma dezena de espécies afins convivendo na esterqueira de cavalo onde essas moscas se criavam; material colhido cerca de quinze anos antes sobre mosca doméstica, em São Paulo, revelou-se ainda a mesma espécie. Portanto, ficamos conhecendo bem a espécie de *Macrocheles* que costuma fazer-se transportar pela mosca doméstica em São Paulo.

Por outro lado, considerando que, muito provavelmente, o complexo "esterqueira de cavalo — mosca doméstica — ácaro em questão" devesse ser fenômeno caracteristicamente cosmopolita, decidímo-nos a considerar tal peculiaridade ecológica o carater básico para a identificação do nosso material. Com este fito realizamos cuidadosa revisão da literatura sobre o assunto, encontrando uma série de informações interessantes.

Macrocheles badius (KOCH), segundo determinação de BANKS, foi assinalada sobre *Scatophaga stercoraria* L. por WEISS (1915), em New Jersey; *Macrocheles muscae* EWING, 1913, que identificamos à espécie agora estudada por nós, foi obtida de *Musca domestica* L. em Ithaca, N. Y. e em Corvallis, Oregon; *Holostaspis sita* TROJAN, 1908, colhida sobre *Calliphora vomitoria* L., em Praga, foi acompanhada de excelentes fotografias que demonstram sua identidade com o nosso material; material colhido sobre mosca doméstica em São Paulo (Brasil) por H. VON IHERING e remetido por este a S. A. POPPE, examinado mais tarde por OUDEMANS (1904) "proved to be nothing but our known *Macrocheles badius* (C. L. KOCH), which seems to be a cosmopolitan", nome que adotamos provisoriamente, por ser altamente provavel que se tratasse da mesma espécie agora estudada, que ficava, deste modo, encaixada no aranzel nomenclatural dos autores europeus pelas mãos de acarologista idôneo. OUDEMANS (1900 *a*) referiu-a sob a denominação de *Macrocheles* (*Holostaspis*) *marginatus* (HERM.): tritoninfa fêmea (= *Gamasus badius* KOCH), sobre mosca doméstica em Abo e em Bremen. Foi-nos de grande valia o trabalho de LEONARDI (1900), que referiu, como viajando em mosca doméstica, na Europa, somente o *Holostaspis badius* (KOCH) *sensu* BERLESE (1889), o que vinha reforçar seguramente o nosso ponto de vista sobre o assunto. BERLESE (1822 *a b*) consolidou-o mais ainda quando, ao referir o comportamento ecológico do que então considerava tritoninfa ebontomorfa de *Gamasus tardus* KOCH — *Gamasus stercorarius* KRAMER — afirmou "che preferisce la cavalina" (cria-se de preferência em estrume de cavalo) e viaja em mosca doméstica. DUGÈS

(1834) tambem observou-a em mosca, na França, identificando-a corretamente a *Acarus marginatus* HERMANN.

BERLESE (1882 *a b* 1889) barrou infelizmente nossos progressos por longo tempo, pois foi-nos dificílimo interpretar seu conceito de espécie, que finalmente verificamos representar um agrupamento de cerca de quatro espécies lineanas, em virtude do seu imenso equívoco a-propósito-do suposto "polimorfismo" e da imaginária "partenogênese" que ele admitia neste grupo, e que teremos de discutir pormenorizadamente quando tratarmos das outras espécies que vivem nas esterqueiras. O fato é que nos perdemos entre um punhado de nomes aplicados a ácaros muito mal caracterizados, por diversos autores que discordavam bastante entre sí, o que deve ser a causa deste grupo ter permanecido com certo carater de tabú até hoje, a-pesar-de BERLESE (1918) haver tentado pô-lo em ordem, com a sua fragmentação em subgêneros, novamente mal caracterizados, e principalmente por seu lamentavel êrro quanto ao conceito de espécie tipo do gênero.

Foram situações como essa que levaram BANKS (1906) a fazer tabua raza da maior parte da literatura acarológica européia, visando esquecer o passado e recomeçar tudo de novo na América, para se livrar da contingência de resolver tais dificuldades de nomenclatura. Essa maneira de proceder não é recomendavel, pois fugir às dificuldades não lhes traz solução, além de contribuir apreciavelmente para alongar as listas sinonímicas, o que só agrava a confusão.

NOMENCLATURA

Segundo OUDEMANS (1926), que a refere sob a denominação de *Macrocheles badius* (C. L. KOCH, 1839), a espécie em questão foi assinalada pela primeira vez na França, por DE LA HIRE (1730), que não lhe aplicou nome; *Acarus muscarum* SCOPOLI, 1763, *preoc.* L., 1758, foi a primeira designação científica por ela recebida, em material do Tirol; *Acarus muscae domesticae* SCOPOLI, 1772 foi a segunda denominação, embora o autor acreditasse tratar-se de espécie diferente da de 1763; entretanto, alguns caracteres indicados e o hospedeiro não deixam margem para dúvida, motivo que nos leva a adotar a interpretação de OUDEMANS (1929).

O nome dado por SCOPOLI (1772) é apenas na aparência trinominal, pois na realidade ele adotou como específico o binominal do hospedeiro, — *Musca domestica* — o que é admissivel segundo a Opinião n.º 50 da Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica, desde que seja ele emendado de maneira a acomodar-se com a exigên-

cia do Artigo 19 das Regras Internacionais de Nomenclatura Zoológica, para *Acarus muscaedomesticae* SCOPOLI, 1772 *emend.*, o que OUDEMANS (1929, 1936) deixou de fazer oportunamente.

Sob o nome "mite bordée" — *Acarus marginatus* HERMANN, 1804, *preoc.* SULZER, 1776 — é ele assinalado "sur le corps calleux, près de la glande pinéale du cerveau d'un soldat grièvement blessé et mort à l'hôpital militaire", em Paris, muito provavelmente levado por moscas, como admitiram DUGÈS (1834), BERLESE (1889) e OUDEMANS (1929), com o que concordamos; no mesmo trabalho é referido o *Acarus cadaverinus* HERM., que não tem nada a ver com o nosso, e que OUDEMANS (1928) identifica a *Hypoaspis aculeifer* CANESTRINI, embora CANESTRINI e CANESTRINI (1882) e BERLESE (1889) o houvessem considerado sinônimo de *marginatus* HERM.

Sem novos acréscimos ao seu conhecimento, mas principalmente do ponto de vista nomenclatural, foi a espécie referida várias vezes sob os nomes: *Gamasus marginatus* (HERM.) LATREILLE, 1806; *Gammasus marginatus* (HERM.) LEACH *in* SAMOUELLE, 1819, *lapsus calami;* "Macrochèle" *marginatus* (HERM.) LATREILLE, 1825, *nomen nudum; Macrochelus marginatus* (HERM.) GUÉRIN-MÉNEVILLE, 1826, *nomen nudum; Macrocheles marginatus* (HERM.) LATREILLE *in* CUVIER, 1829, tipo do gênero *Macrocheles* LATREILLE *in* CUVIER, 1829; *Macrochelis marginatus* (HERM.) EDWARDS *in* DE LAMARCK, 1838, *lapsus calami; Acarus vegetans, sensu* RASPAIL, 1843, *ex parte,* com excelente desenho da face ventral de uma fêmea, colhida sobre *Aphodius subterraneus* L., mas confundida parcialmente com *Uropoda orbicularis* (O. F. MUELLER) *apud* OUDEMANS (1936); este (1914 *a*), acompanhando BERLESE (1889) inclue na sinonímia tambem *Gamasus latus* C. L. KOCH, 1839, descrito de *Staphilinus olens* MUELLER, o que consideramos mera questão de opinião, pois os caracteres indicados são absolutamente vagos, tornando-se pois perfeitamente justificavel retirá-lo da circulação, seja colocando-o como sinônimo, o que nos parece a solução melhor, seja deixando-o entre as *species inquirendae,* o que é menos conveniente.

O estudo da espécie foi retomado por J. MUELLER (1860), que a colocou no gênero *Holostaspis* KOLENATI, 1858, ao qual, entre outras, consignou as seguintes: *H. glabra* MUELLER, 1860, *H. favosa* MUELLER, 1860 e *H. contigua* MUELLER, 1860. CANESTRINI e FANZAGO (1877) identificaram-na a *Gamasus tardus* C. L. KOCH, 1839. G. CANESTRINI e R. CANESTRINI (1882) consideraram as três espécies de MUELLER (1860) como "altretante forme del *G. marginatus* (HERM.)", fazendo o mesmo com *Gamasus copromorgus* MÉGNIN, 1875; OUDEMANS

(1938) considerou *H. favosa* uma espécie de *Geholaspis* BERLESE e *H. contigua* do gênero *Eulaelaps* BERLESE, negando entretanto que a espécie de MÉGNIN fosse *muscaedomesticae* SCOPOLI (= *marginatus* HERM.).

Gamasus stercorarius KRAMER, 1876, é a referência seguinte, em *Geotrupes stercorarius* L., embora confundido nomenclaturalmente com *G. marginatus* KOCH, 1839 = *Eulaelaps leucurus* (SCHRK., 1781), *nec Acarus marginatus* HERM. Tal nome iria ser adotado tambem por R. CANESTRINI (1881) e parcialmente por G. CANESTRINI e R. CANESTRINI (1882) e BERLESE (1882 *a b*, 1889) que lançaram em 1882, independentemente, suas idéias quanto ao complexo conceito de espécie neste grupo; os CANESTRINI admitiam, além de uma hipotética partenogênese, já esboçada por G. CANESTRINI (1881) e destinada a justificar a aparente escassez de machos que é observada nas condições naturais de vida, fenômeno que já havia impressionado KRAMER (1876), um polimorfismo todo particular, compreendendo as chamadas "formas de desenvolvimento", "formas sexuais" e "formas de adaptação". Assim, o conceito de *Holostaspis marginatus* (HERM.) abrangia "la prima forma giovanile", que deixaram inominada, "la seconda forma giovanile" — "il *G. marginatus* HERMANN o *G. stercorarius* KRAMER" — e a "femmina adulta (*G. tardus* KOCH)"; parece-nos profundamente significativo que ao nome coletivo *marginatus* tenha sido atribuido, além desta acepção ampla, a outra, restricta, de equivalente a *stercorarius*.

BERLESE (1882 *a b*) adotou a idéia fundamental dos CANESTRINI, dando-lhe entretanto desenvolvimento mais extremado no trabalho de 1889, — cuja data de publicação obtivemos em BERLESE (1921) — quando seu conceito de *Holostaspis marginatus* (HERM.) BERL., 1899 passou a compreender: a. — "Adultus mas."; b. — "Adultus foem." (= *Acarus marginatus* HERM. = *A. cadaverinus* HERM. = *Gamasus latus* KOCH = *G. tardus* KOCH = *Holostaspis favosa* J. MUELLER = *Gamasus copromorgus* MÉGNIN); c. — *Holostaspis badius* (KOCH) BERL., "mas." *sive Holostaspis marginati* "tritonympha mas." (= *Gamasus heringi* HALLER, 1882); d. — *Holostaspis badius* (KOCH) BERL. "foem." *sive Holostaspis marginati* "tritonympha foem." (= *G. carinatus* KOCH = *H. glabra* J. MUELLER = *G. stercorarius* KRAMER = *G. tardus* KOCH "tritonympha" BERL., 1882 *a b* = "la seconda forma giovanile" G. *et* R. CANESTRINI, 1882); e. — *Holostaspis merdarius* BERL., 1889 *sive Holostaspis marginati* "protonympha" (= "la prima forma giovanile" G. *et* R. CANESTRINI, 1882); f. — "forma intermedia

generans inter *merdarium* et *badium* foem."; g. — "forma intermedia generans inter *badium* et *adultum* foem.".

Da análise cuidadosa dos caracteres referidos nesta inflação de nomes, regula para nós uma observação de importância fundamental: a de que, segundo BERLESE (1889), no que aliás concorda com DUGÈS (1834), *Holostaspis badius* "foem." viaja em moscas, o que explicaria ter sido encontrado por HERMANN (1804) no crâneo de um soldado, correspondendo portanto a *Acarus muscaedomesticae* SCOPOLI, 1772, ou seja, ao tipo do gênero *Macrocheles* LATR.; de fato, como assinala OUDEMANS (1929), o conceito de *marginatus* HERM., *nec* SULZER, 1776, espécie que mede apenas 1,13 mm, cabe a *badius* BERL., 1889, *nec* KOCH, 1839, e não a *marginatus* BERLESE, 1889, *nec* HERMANN, 1804, que pode alcançar dimensões da ordem de 1,8 mm. Além disso, *badius* BERL. cria-se de preferência no estrume de cavalos e costuma viajar em moscas, ao passo que *marginatus* "adultus foem." BERL. prefere estrume bovino e não se faz transportar por moscas.

A consequência mais importante da negligência de BERLESE (1889) no aplicar adequadamente os nomes disponiveis às várias "formas" da sua espécie coletiva, a que foi provavelmente arrastado pelas relações de tamanho existentes entre elas, consiste em que, com a transposição do conceito de *marginatus* HERM. (= *muscaedomesticae* SCOPOLI) para *marginatus adultus* BERL., que na realidade é espécie muito diferente, para a qual já foi proposto outro nome — *Nothrholaspis fimicola* SELLNICK, 1931 — por ocasião de BERLESE (1918) fragmentar *Macrocheles* LATR. em subgêneros, considerou como tipo de *Macrocheles* (*Macrocheles*) o *marginatus* BERL., diferente do *marginatus* HERM., o indicado por LATREILLE *in* CUVIER (1829) para tipo do gênero, ao passo que BERLESE colocou o verdadeiro *marginatus* HERM. como tipo do seu *Macrocheles* (*Coprholaspis*), com a atribuição de prioridade a *Macrocheles* (*Coprholaspis*) *glaber* J. MUELLER, 1860), sob cuja sinonímia poz *G. stercorarius* KRAMER e *H. badius*. BERLESE.

Portanto, o subgênero *Coprholaspis* BERLESE, 1918, cai na sinonímia do subgênero *Macrocheles* LATR., atualmente gênero *sensu str.*, pois ambos estão baseados na mesma espécie tipo.

Ao subgênero *Macrocheles* BERL., 1918 seria necessário atribuir novo nome; entretanto SELLNICK (1931) não conseguiu distinguí-lo de *Nothrholaspis* BERL., 1918, que tem como tipo *N. carinatus* (KOCH, 1839) (= *H. tridentinus* G. *et* R. CANESTRINI, 1882 = *M. hippochttonius* OUDMS., 1913); como tivessemos encontrado a mesma di-

ficuldade, preferimos deixá-lo provisoriamente incorporado a *Nothrholaspis*, até esclarecimento perfeito da sua situação.

BERLESE (1918) retoma a nomenclatura das "formas" de *Holostaspis marginatus americanus* BALZAN *et* BERLESE, 1888, que então erige em espécie — *Macrocheles* (*Macrocheles*) *americanus* (BALZ. *et* BERL.) — atribuindo-lhe a seguinte sinonímia: a. — "adultus" (= *G. tardus* KOCH, 1839 = *H. confusa* FOÁ, 1900); b. — "tritonympha foem." (= *G. stercorarius* KRAMER, 1876 = *Macrocheles* (*Coprholaspis*) *mundus* BERLESE, 1918); c. — "tritonympha mas." (= *Macrocheles vagabundus neotropicus* BERLESE, 1918, *nec Macrocheles vagabundus* OUDEMANS, 1931 = *Holostaspella ornata* BERLESE, 1904 = *Holostaspella ornata* OUDMNS., 1931); d. — "protonympha" (= *Macrocheles (Coprholaspis) perparvulus* BERLESE, 1918) que considera diferente de *Holostaspis merdarius* BERL., 1889, com que a comparara em trabalho anterior.

Relativamente a essa coletânea de nomes, a diagnose de *M. mundus* coincide satisfatoriamente com o conceito de *muscaedomesticae;* o que não é muito compreensivel foi ter BERLESE erigido em nova espécie um bicho que ele próprio considerara igual a *stercorarius.* Ainda no mesmo trabalho identifica *H. sita* TROJAN, 1908, conhecida apenas através de fêmeas, a *Macrocheles (Coprholaspis) posteroarmatus (*BERLESE, 1904), baseada em um espécime macho; concordamos com essa sinonímia, pois a diagnose de *posteroarmatus* feita por BERLESE serve admiravelmente bem para os machos de *muscaedomesticae* SCOPOLI, o que nos leva a incluí-la tambem na sinonímia da espécie, como já haviamos feito com *sita.* Naturalmente este fato acarreta a necessidade da reconsideração de *Macrocheles* (*Coprholaspis*) *posteroarmatus novimundi* BERLESE, 1918, que nos parece não ser uma subespécie, como havia parecido a BERLESE ao erigí-la em variedade, e sim uma espécie diferente — *Macrocheles novimundi* BERL. — cuja situação analisaremos em trabalho ulterior.

A primeira tentativa de reação contra as idéias de BERLESE deve-se a FOÁ (1900), que conseguiu criar algumas espécie de *Macrocheles* fimícolas, refutando a alegada partenogênese e o suposto polimorfismo das espécies berleseanas. Os resultados conseguidos por essa pesquisadora, a-pesar-de muito interessantes, deixaram de ter a repercussão devida no esclarecimento definitivo do assunto, não só por deficiência técnica no exame e caracterização do material, como principalmente pelo prestígio que cercava a autoridade de BERLESE e ainda a displicência deste pelos que não rezavam pela sua cartilha.

Foá encarou *badius* Berl. como bôa espécie e não como simples estádio ninfal de *marginatus* Berlese.

Oudemans (1900 *a b*) adotou o nome genérico *Macrocheles* Latr. para esta espécie, primeiramente (1900 *a*) como *Macrocheles* (*Holostaspis*) *marginatus* (Herm.) tritoninfa ♀", depois (1900 *b*) como "*Macrocheles marginatus* (Herm.) tritoninfa homoiomorfa ♀ ", que mais tarde (1915) ele iria considerar simples anomalia da segunda forma de 1900 *b* — a "tritoninfa heteromorfa ♀ " (= *G. badius* Koch). Aliás, a mesma denominação genérica havia sido usada antes por Berlese (1885), que a repudiou mais tarde por motivos sentimentais, para só retomá-la em 1918.

Oudemans (1915) coloca na sinonímia de *G. latus* Koch, 1839 sua espécie recemnoticiada — *Macrocheles vulgaris* Oudmns., 1914 *b* — que se torna portanto sinônimo de *muscaedomesticae* Scopoli.

Oudemans (1915) erige em espécie distinta — *Macrocheles hamatus* Oudmns., 1915 — a "forma" descrita no seu trabalho de 1900 *b* como protoninfa de *Macrocheles marginatus* (Herm.), que então reconhece ser uma deutoninfa. Esta corresponde bem exatamente à deutoninfa que se transformará em fêmea de *Macrocheles muscaedomesticae* Scopoli, de que se torna sinônimo, portanto.

Oudemans (1902 *a*) identificou-a em material italiano como tritoninfa homoiomorfa de *Macrocheles marginatus* (Herm.); o mesmo autor (1902 *b*) refere material desta espécie colhido na França como 15 "tritonymphae heteromorphae femininae generantes" de *M. marginatus* (Herm.).

Oudemans (1904) reconheceu pela primeira vez em suas publicações esta espécie como distinta de *marginatus* Berl., sob o nome *badius* Koch, o que tornou a fazer ainda em 1926. Em 1929 e 1936 reivindicou a prioridade de *muscae domesticae* Scopoli, porem sem emendar o nome.

No seu trabalho de 1914 *a* Oudemans proclama *Holostaspis badius* Berlese, 1889 diferente de *Gamasus badius* C. L. Koch, 1839. Oudemans (1914 *a*) identifica *badius* Berl. a *latus* Koch, 1839. Sellnick (1941) coloca *badius* Koch no gênero *Celaenopsis* Berlese.

Encontramos na literatura ao nosso alcance mais duas espécies que não conseguimos distinguir da que é objeto deste trabalho: *Macrocheles marginatus littoralis* Halbert, 1915 e *Holostaspis spinitarsis* G. Canestrini, 1897, que achamos conveniente considerar, ao menos provisoriamente, como seus sinônimos.

HULL (1925), ao considerar a situação de *Macrocheles marginatus* (HERM.), assinala a diferença de conceitos entre "HERM.-BERL." e "HERM.-OUDMNS.", deixando porem de analisar o problema e adotando a autoridade de BERLESE como árbitro da questão. Entretanto, admitindo que as duas espécies devessem necessariamente pertencer a subgêneros diferentes, o que resta demonstrar, e como *marginatus* "HERM.-BERL." arrastaria comsigo o nome genérico *Macrocheles*, do qual considera sinônimo *Dissoloncha* FALCONER, 1923, propõe o novo nome subgenérico *Macrocheles* (*Monoplites*) HULL, 1925 para a espécie correspondente ao conceito de *marginatus* "HERM.-OUDMNS.", para a qual propõe tambem novo nome: *Macrocheles* (*Monoplites*) *oudemansii* HULL, 1925.

Entretanto, como *marginatus* "HERM.-BERL." = *muscaedomesticae* SCOPOLI, e como esta espécie é realmente o *marginatus* HERMANN, e portanto o tipo do gênero *Macrocheles* LATR., *Macrocheles* (*Monoplites*) *oudemansii* HULL é sinônimo de *Macrocheles muscaedomesticae* SCOPOLI, e portanto o subgênero *Monoplites* torna-se sinônimo do subgênero *Macrocheles* por identidade de genótipos.

Temos a impressão de que o conflito BERLESE-OUDEMANS é mais aparente do que real no que concerne ao conceito de *marginatus* HERMANN. Ambos autores mantiveram-se geralmente de acôrdo no pouco de estudo verdadeiramente zoológico realizado neste grupo. Quanto à nomenclatura mesmo, onde as divergências se tornaram maiores, começou sendo a mesma para ambos, com a diferença de haver BERLESE permanecido até certo ponto indiferente às questões de prioridade, ao passo que OUDEMANS sempre se esforçou por obedecer às Regras Internacionais de Nomenclatura Zoológica.

MACROCHELES MUSCAEDOMESTICAE (SCOPOLI, 1772) EMEND.

SINONÍMIA

Acarus muscarum SCOPOLI, 1763; *preoc.* L., 1758.
Acarus muscae domesticae SCOPOLI, 1772.
Acarus marginatus HERMANN, 1804, *preoc.* SULZER, 1776.
Gamasus marginatus (HERM.) LATREILLE, 1806.
Gammasus marginatus (HERM.) LEACH *in* SAMOUELLE, 1819; *lapsus calami.*
"Macrochèle" *marginatus* (HERM.) LATREILLE, 1825; *nomen nudum.*
Macrochelus marginatus (HERM.) GUÉRIN-MÉNEVILLE, 1826; *nomen nudum.*
Macrocheles marginatus (HERM.) LATREILLE *in* CUVIER, 1829; *genotypus.*
Macrochelis marginatus (HERM.) EDWARDS *in* LAMARCK, 1838; *lapsus calami.*
Acarus vegetans DE GEER, 1768 *sensu* RASPAIL, 1843, *partim.*
Holostaspis glabra J. MUELLER, 1860.
Gamasus stercorarius KRAMER, 1876.
Gamasus tardus C. L. KOCH, 1839, *partim*, CANESTRINI *et* FANZAGO, 1877.

Holostaspis marginatus (HERM.): "seconda forma giovanile" G. *et* R. CANESTRINI, 1882.
Gamasus tardus KOCH: "tritonympha" BERLESE, 1882 *a b*.
Holostaspis marginatus americanus: "tritonympha foem." BALZAN *et* BERLESE, 1888.
Gamasus latus C. L. KOCH, 1839, *partim*, BERLESE, 1889.
Holostaspis badius (KOCH) BERL. "sive Holostaspis marginati tritonympha mas. et foem". BERLESE, 1889.
Gamasus heringi HALLER, 1882, *apud* BERLESE, 1889.
Holostaspis spinitarsis CANESTRINI, 1897.
Holostaspis badius (KOCH-BERL.) FOÁ, 1900.
Macrocheles (Holostaspis) marginatus (HERM.): "tritonympha ♀ " OUDEMANS, 1900 *a*.
Macrocheles marginatus (HERM.): "protonympha" OUDEMANS, 1900 *b*.
Macrocheles marginatus (HERM.): "tritonympha homoiomorpha ♀ " OUDEMANS, 1900 *b*.
Macrocheles marginatus (HERM.): "tritonympha heteromorpha ♀ " OUDEMANS, 1900 *b*.
Macrocheles marginatus (HERM.): "tritonymphae heteromorphae femininae generantes" OUDEMANS, 1902 *b*.
Holostaspis posteroarmatus BERLESE, 1904.
Macrocheles badius (KOCH-BERL.) OUDEMANS, 1904.
Holostaspis sita TROJAN, 1908.
Macrocheles muscae EWING, 1913.
Macrocheles vulgaris OUDEMANS, 1914 *b*.
Macrocheles hamatus OUDEMANS, 1915.
Macrocheles marginatus littoralis HALBERT, 1915.
Macrocheles (Coprholaspis) glaber (J. MUELLER) BERLESE, 1918.
Macrocheles (Coprholaspis) mundus BERLESE, 1918.
Macrocheles (Monoplites) oudemansii HULL, 1925.
Macrocheles muscae domesticae (SCOPOLI) OUDEMANS, 1936.

MATERIAL E TÉCNICA

A descrição da espécie tem por base material obtido em esterqueira, no Instituto Biológico de São Paulo, criado posteriormente em laboratório nas culturas de mosca doméstica feitas em fezes de cavalo, para fins de xenodiagnóstico da habronemose, realizadas por M. J. DE MELLO e, finalmente, criadas em cultura pura segundo a técnica de PEREIRA e CASTRO (1945).

O estudo acurado da genitália das fêmeas e do epistômio requereu o uso da técnica de impregnação argêntica de PEREIRA e CASTRO (1943).

Sempre que possivel ou indicado, as medidas foram tomadas em vários exemplares, sendo apresentadas sob a forma das respectivas médias, seguidas do seu erro padrão e indicação dos valores extremos.

DESCRIÇÃO

GENERALIDADES

As dimensões nas diversas fases desta espécie, exclusive os machos, são de valor precário, pois o tegumento membranoso é muito distensivel, dando margem a uma grande flutuação no tamanho, que depende essencialmente do estado de repleção do aparelho digestivo. Por este motivo, adotamos como critério para o estudo das dimensões o tamanho do escudo dorsal, o que infelizmente é inaplicavel às protero e protoninfas. Neste caso, cingimo-nos exclusivamente ao estudo das quelíceras e das quelas.

A coloração das diversas fases da espécie depende do seu grau de esclerosamento; os adultos tendem para uma côr pardo-avermelhada, que atinge nas fêmeas um tom mais carregado; as deutoninfas chegam a ficar apenas ligeiramente amareladas, ao passo que os dois estádios iniciais permanecem esbranquiçados.

O contorno dos machos lembra à primeira vista um losângo, do qual salientam particularmente reforçadas as pernas II e IV, principalmente as últimas, que lhes conferem uma andadura desajeitada, o que não acontece nas fêmeas, de contorno ovalado, que, depois de alimentadas, fica marginado lateral e posteriormente por um crescente branco de tegumento membranoso.

FÊMEA

(FIGS. 1-8)

Gnatosoma

E' um tubo quitinoso bem esclerosado, formado pela coalescência de uma chapa dorsal, arqueada — o epistômio — com outra ventral, plana — o hipofaringe — por intermédio de duas peças latero-ventrais — as maxilicoxas. O gnatosoma encerra três tuneis antero-posteriores, dois dos quais dorsais e paramedianos, contendo as quelíceras, e um mediano e ventral — a cavidade bucal — que é delimitada superiormente pelo labro.

O epistômio tem sua margem distal irregularmente denticulada e emite um processo mediano anterior, que se divide em três ramos pouco além da base: os dois laterais se expandem para a frente, em forma de triângulo com base anterior e estreita, ao passo que o mediano, mais longo, bifurca-se em dois raminhos terminais ponteagudos. O ramo mediano possue ventralmente uma fileira longitudinal de minusculas saliências de tamanho variavel, com a aparência de pequeninos pelos.

A conformação do epistômio (fig. 1) é sujeita a amplas variações, tais como aumento ou redução na extensão das duas incisões que separam seus três ramos, com ou sem simetria, podendo chegar ao extremo de desaparecer praticamente um deles; a bifurcação terminal do ramo mediano pode afastar-se da norma, tambem pela deficiência no desenvolvimento de um dos raminhos, como se vê na fig. 11, referente às deutoninfas.

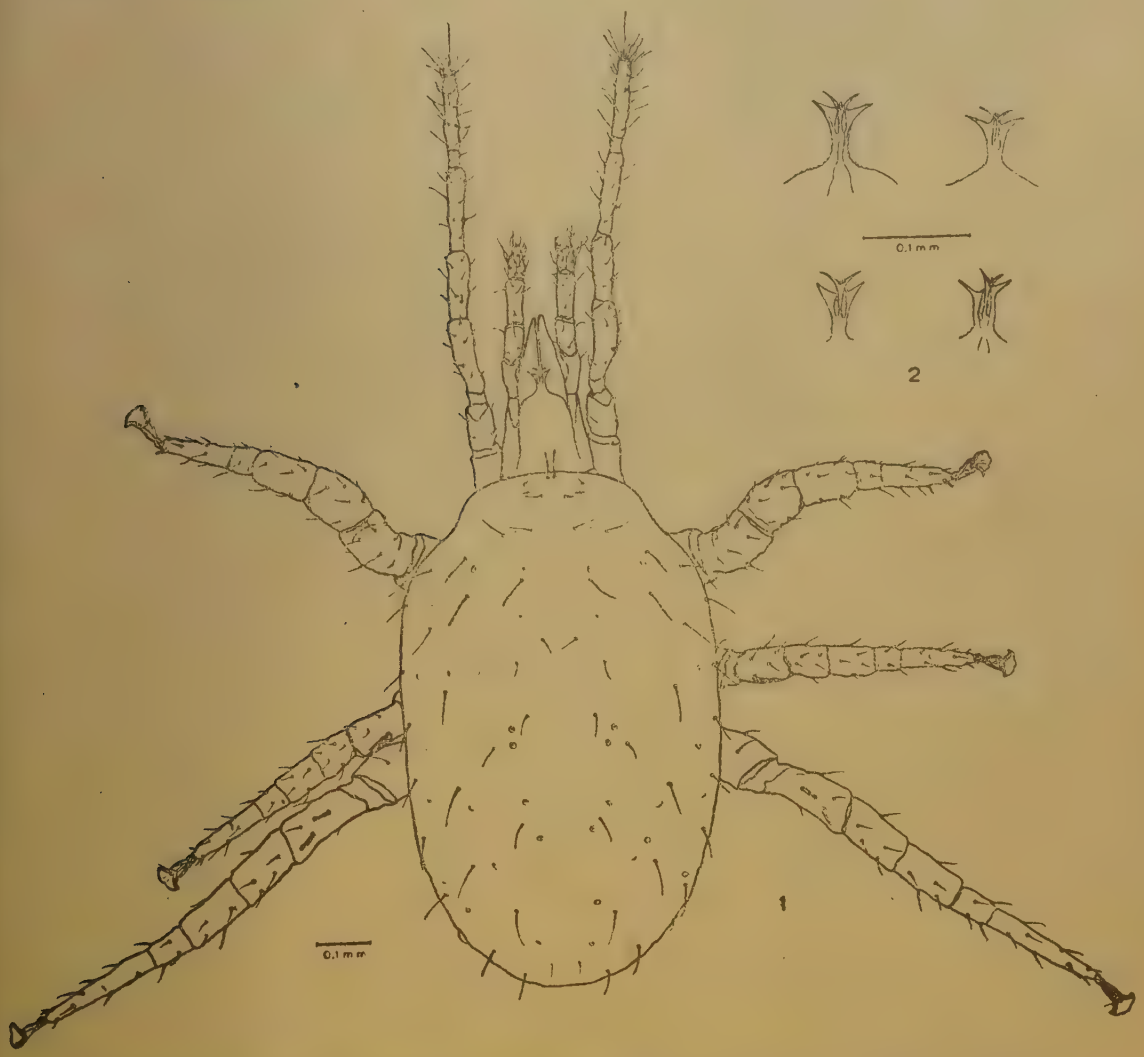
Do estudo do epistômio conclue-se que as peculiaridades porventura encontradas em um ou outro exemplar isolado, teem mais frequentemente a significação de anomalias do que de caracteres específicos.

As maxilicoxas constituem a totalidade das paredes laterais e ainda ocupam lateralmente grande parte da face ventral do gnatosoma. Teem distal e lateralmente os forames onde se articulam os palpos que são compostos de cinco segmentos articulados: 1 — o trocânter, longo e convexo dorsalmente, com duas cerdas ventrais; 2 — o femur, com a metade do comprimento do trocanter, tendo três cerdas dorsais e duas laterais; 3 — o geno, um pouco mais comprido do que o precedente, com três cerdas dorsais e três laterais, sendo duas destas implantadas juntas, medialmente; 4 — a tíbia, pequena, com cerca de dez cerdas, na maioria dorsais; 5 — o tarso, que se articula com a tíbia segundo um plano em bisel obtido à custa principalmente da face ventral e um pouco da medial do artículo, de tal modo que seu maior comprimento encontra-se ventral e medialmente; este artículo tem uma cerda em garfo trífido na base, e subapicalmente outra, simples, grossa e rígida, alem de ter ainda toda a superfície restante densamente recoberta por cerdas finas de dimensões variadas.

O hipofaringe tem uma diferenciação longitudinal mediana, a goteira hipofaringeana, que é interseptada por cinco linhas transversais formadas por fileiras de dentículos quitinosos bem esclerosados. O hipofaringe emite dois ramos anteriores justamedianos — as lacínias — que são recobertas por pelos finíssimos. Nos dois lados desta bifurcação implantam-se os corníçulos maxilares, que são as peças mais esclerosadas da região, constituidas por uma superfície plana, mais ou menos triangular. No hipofaringe encontram-se quatro pares de cerdas: um anterior — cerdas maxilares anteriores — outro posterior — cerdas maxilares posteriores — e dois intermédios, próximos um do outro, dos quais o mais medial — cerdas

maxilares intermédias mediais — é o mais longo de todos, ao passo que o mais lateral — cerdas maxilares intermédias laterais — é o mais curto.

Dorsal e anteriormente ao hipofaringe situa-se o labro, que se projeta para frente com a forma de lingueta ponteaguda revestida por pelos.



Macrocheles muscaedomesticae (Scopoli): Fêmea. Fig. 1 — face dorsal; fig. 2 — epistômios.

Entre o labro e a base das lacínias fica delimitada uma câmara de paredes quitinosas bem esclerosadas, que desempenha as funções de cavidade bucal, no fundo da qual tem início o faringe, tubo musculoso que se estende até o nivel da articulação gnato-idiosômica.

Dorsal e lateralmente ao hipofaringe, em plano pouco inferior ao dos cornículos, projetam-se para a frente os estiletes. Estes originam-se como peça única, que se bifurca em dois ramos muito delgados e desiguais logo acima da base, o que empresta ao conjunto o aspecto de um *J;* o ramo longo — estilete propriamente dito — dirige-se para a frente e medialmente, enquanto o curto, cujo comprimento é cerca de metade do outro — duplicata do estilete — orienta-se de preferência lateralmente.

As quelíceras deslisam em dois túneis anteroposteriores e paramedianos, situados entre o epistômio e as peças do hipofaringe. Cada quelícera é constituida por três segmentos: o 1.º, pouco esclerosado, na base do qual se inserem os músculos retratores da quelícera; o 2.º, mais esclerosado, prolonga-se anteriormente em um apêndice que se torna o dedo fixo da quela, ao nivel de cuja base é inserido o 3.º artículo, bem esclerosado, que é o dedo movel da quela; o 2.º artículo tem uma lirifissura na face medial, próximo à inserção do dedo movel.

Os dedos da quela terminam em ponta aguda e recurva e apresentam um dente bem esclerosado, grande, situado no gume, a meia distância das extremidades. O dedo fixo tem subapicalmente um dentinho e uma incisão onde se encaixa a ponta do dedo movel, e logo abaixo desta uma cerda hialina e rígida — o pelo dentário — alem de outra cerda rígida junto à base do lado externo; na base do dedo movel, na membrana sinartrodial insere-se o flagelo, que é uma cerda grossa, quasi do comprimento do próprio dedo, revestida de pelos longos, alem de uma segunda formação idêntica, mas muito pequena, que se implanta ao seu pé.

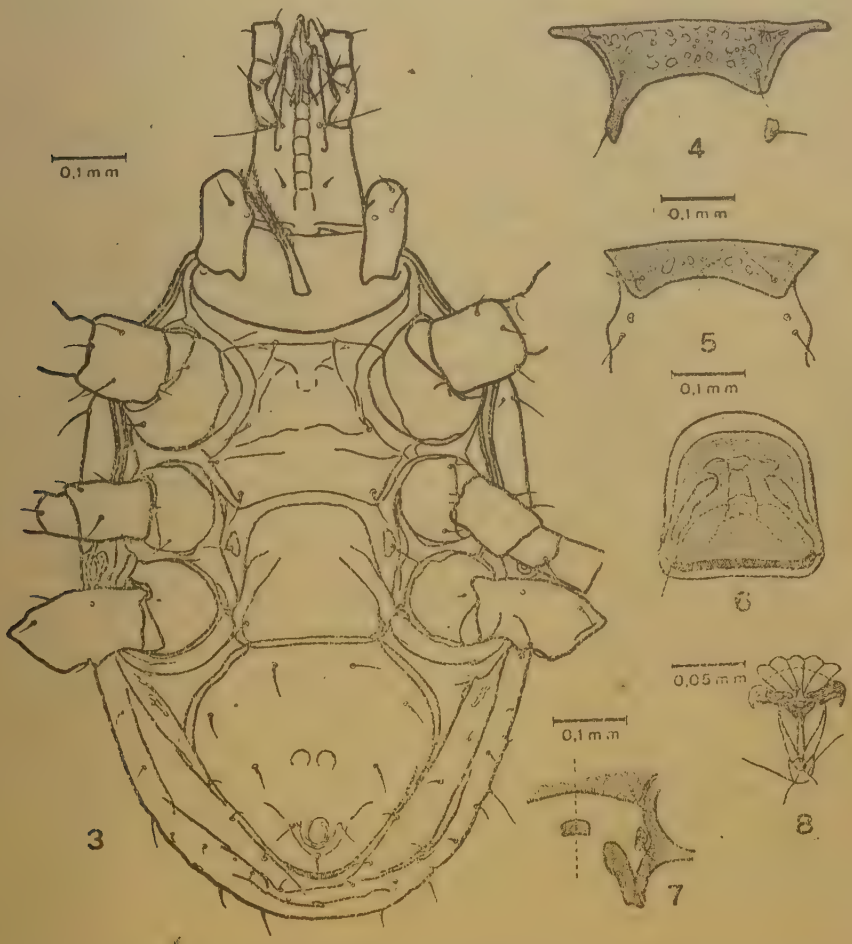
Quando a quelícera está protraida, o primeiro segmento fica protegido por um manguito membranoso que se insere distalmente na articulação do primeiro com o segundo segmento e, proximalmente, na base do epistômio e partes moles do gnatosoma. Quando a quelícera se retrai o manguito membranoso é envaginado, abrigando todo o primeiro e boa parte do segundo artículo.

Idiosoma

Face dorsal (Fig. 2)

E' recoberta pelo escudo dorsal, que tem as dimensões seguintes (N = 20): comprimento — 0,98 ± 0,010 (0,89 — 1,07 mm); largura — 0,56 ± 0,004 (0,49 — 0,60 mm). Sua forma é elipsoide, com o eixo menor deslocado anteriormente, tendo ligeira depressão situada entre as inserções das pernas I e II. E' bem es-

clerosado, com esculturações escamoides, que assinalam uma linha transversal muito pouco nítida entre os forames de inserção das pernas III e IV. E' revestido por cerdas esparsas, ao todo vinte e nove pares, todas simétricas. Destas cerdas, algumas são pequenas e finas, ao passo que quasi todas são bem desenvolvidas. Dentre



M. muscaedomesticae (Scopoli): Fêmea. Fig. 3 — face ventral; fig. 4 — escudo metasternal direito fundido ao esternal; fig. 5 — ausência de metasternais; fig. 6 — epigíneo; fig. 7 — endogíneo, paragíneo e metasternal; fig. 8 — ambúlacro.

as últimas ha algumas — as verticais, as umerais e as do rebordo posterior — com a extremidade distal finamente barbelada. Tem ainda dezoito pares de lirifissuras, tambem dispostas simetricamente, as quais, com exceção das situadas nas proximidades das cerdas verticais, são atípicas, tendo forma areolar.

Face ventral (Fig. 3)

A faixa ânteroposterior da superfície ventral, limitada lateralmente pelas inserções das pernas, é quasi toda ocupada pelos escudos ventrais.

O anterior — escudo esternal — que chega a atingir posteriormente o nivel do meio do forame da coxa III, envia anterior e lateralmente um par de expansões — processos anteriores — entre os quais fica delimitado anteriormente o gnatosoma, e lateralmente aos quais situam-se os forames das coxas II; lateralmente ha os processos intermédios, que se insinuam entre os forames coxais II e III, delimitando entre estes e os processos anteriores o arco medial do forame da coxa II; os processos posteriores são discretos e situam-se ao nivel da metade do forame coxal III, sendo unidos por meio de uma linha de concavidade posterior, que limita posteriormente o escudo.

No escudo esternal ha três pares de cerdas: as cerdas anteriores, situadas junto ao rebordo anterior, nos limites dos seus quartos laterais, as cerdas médias, pouco anteriores ao processo intermédio, lateralmente, à altura do forame da coxa II, e as cerdas posteriores, nos processos posteriores. Tem tambem dois pares de lirifissuras, as lirifissuras anteriores, logo atrás das cerdas anteriores e as lirifissuras médias, no processo intermédio.

O esterno apresenta a superfície esculturada com aréolas em baixo relevo, arredondadas e irregulares, sendo tambem atravessado por linhas mal definidas, das quais uma é anterior, transversal, à altura das cerdas anteriores; um par surge nas lirifissuras anteriores e converge posteriomente para a linha mediana; um par dirige-se do meio das últimas para a inserção das cerdas médias; uma linha transversal, com ligeira convexidade anterior, une as duas cerdas médias e, finalmente, das lirifissuras posteriores sai um par em direção à linha mediana, mas sem chegar a atingí-la.

O par de escudos metaesternais encontra-se lateralmente sobre a linha que separa as inserções das pernas III e IV; tem forma triangular, com uma lirifissura no ângulo anterior e uma cerda do tipo das do escudo esternal ao centro. Os escudos metaesternais podem fundir-se com o processo posterior correspondente do escudo esternal (fig. 4) ou então faltar completamente, caso em que permanecem, assinalando seu lugar, as respectivas lirifissura e cerda (fig. 5).

Situada entre o escudo esternal e o ventrianal, a genitália é constituida por quatro escudos: dois ímpares medianos e um par lateral. Dos medianos, um é superficial, trapezoidal — o epigíneo (fig. 6) — e serve de opérculo à vulva; o outro, pequeno, quadrangular — o endogíneo (fig. 7) — fica situado por baixo do primeiro, que o esconde completamente; o par lateral — as "nymphae" de Berlese — que preferimos denominar paragíneos (fig. 7) (termo que o mesmo autor considera equivalente de escudos metaesternais, do que discordamos), fica tambem oculto pelo epigíneo, articulando-se entre o endopódio e o 3.º parapódio.

O epigíneo (fig. 6) consta de uma porção central bem esclerosada, com a superfície apresentando esculturações em escamas, cujo desenho é relativamente constante, e onde se encontram um par de cerdas e outro de lirifissuras. Alem desta porção, que é facilmente visivel, nota-se uma faixa periférica, tão pouco esclerosada que deixou de ser observada por alguns autores, mas que pode ser posta em evidência muito facilmente pela impregnação argêntica. O epigíneo move-se sobre um eixo que passa por seu rebordo posterior, deixando então a descoberto a vulva, abertura compreendida entre o epigíneo e uma membrana que se prende aos paragíneos e ao endogíneo.

O escudo ventrianal é posterior ao epigíneo e tem as seguintes dimensões (N = 20) : comprimento — 0,34 ± 0,004 (0,30 — 0,38 mm) ; largura — 0,35 ± 0,004 (0,31 — 0,39 mm). Tem a forma de um pentágono irregular, de cantos arredondados, dos quais o mais saliente é dirigido para trás; sua superfície é plana, com escamosidades, exceto no ângulo posterior, onde apresenta pequena eminência, no topo da qual se abre o anus trioperculado, que é acompanhado por duas cerdas laterais e uma posterior. Posteriormente ao anus diferencia-se uma faixa estreita que bordeja a margem correspondente do escudo — a área porosa — limitada lateralmente por duas lirifissuras. O escudo ventrianal exibe ainda um par de cerdas próximo aos ângulos anteriores, outro junto aos ângulos laterais e um terceiro equidistante do 2.º par e das cerdas laterais do anus. Na zona central do escudo existem ainda duas manchas claras, grandes, arredondadas, bem próximas uma da outra, com redução do esclerosamento.

Lateralmente aos forames coxais situa-se o par de escudos peritremáticos, cujo limite posterior fica ao nivel da porção anterior do forame da coxa IV, atingindo sua maior largura na porção entre os forames das coxas III e IV, para se afinarem progressi-

vamente à medida que se dirigem para a frente, transformando-se então em estreita faixa de quitina bem esclerosada que atinge o forame da coxa II, a cuja altura se fundem com o escudo dorsal. Na extremidade posterior do escudo peritremático abre-se o estigma respiratório, que dá acesso a uma pequena câmara subestigmática, da qual partem três grossos troncos traqueais. O estigma liga-se a um tubo fortemente esclerosado — o peritrema — que se dirige a princípio para trás, para em seguida recorrer e prosseguir anteriormente, sob a coberta do escudo peritremático, até as vizinhanças das cerdas verticais do escudo dorsal.

As porções do tegumento membranoso situadas entre os escudos e outras regiões fortemente esclerosadas do corpo são esbranquiçadas, podendo-se distinguir as membranas articulares, como a anterior, que articula o gnatosoma e as pernas I ao idiosoma, assim como as correspondentes à articulação das pernas II, III, IV, e as membranas interescutais, que preenchem os claros deixados pelos escudos. As primeiras são lisas e desprovidas de particularidades, a não ser a existência de um apêndice hialino mediano, ao nivel das pernas I — o mento ou tritosterno — constituido por uma base trapezoidal alta, que dá origem a dois apêndices longos, revestidos de barbelas finíssimas. As membranas interescutais são elásticas e finamente pregueadas, permitindo distensão consideravel da face ventral, de tal modo que as dimensões totais do bicho deixam de ter qualquer significação, pois dependem fundamentalmente do estado de turgência do idiosoma. A possibilidade de distender vai ao ponto de, quando o animal está bem nutrido ou ovado, visto de cima, apresentar uma faixa branca em crescente, que excede as dimensões do escudo dorsal, comunicando ao ácaro o carater "marginado". Esta faixa é revestida de cerdas finas e curtas e exibe, lateralmente ao escudo ventrianal, um par de manchas relativamente mais esclerosadas, de contornos como que corroidos irregularmente, representando, provavelmente, vestígios dos escudos metapodais.

As pernas II, III e IV implantam-se no idiosoma por meio de articulações pouco moveis nos respectivos forames coxais, que são circulares e bem esclerosados; o do 2.º par é mais amplo do que os outros e limitado lateralmente por um semicírculo — o parapódio — cuja extremidade anterior se liga com a projeção anterior do escudo esternal, e cuja extremidade posterior com a projeção intermédia do mesmo escudo, ao passo que o semicírculo medial é constituido pela porção do rebordo lateral do escudo esternal situada entre

as suas projeções anterior e intermédia; o do 3.º par é constituido por um parapódio lateral e um correspondente endopódio medial; o do 4.º par tem seu parapódio situado lateroposteriormente, ao passo que seu endopódio é fundido com o anterior, de modo a existir apenas um escudo endopodial, comum aos forames das pernas III e IV.

Pernas

O 1.º par de pernas afasta-se completamente dos demais, não só pela morfologia, como pela função e local de inserção. E' anteniforme, delgado, desprovido de ambúlacros, tem cerdas tacteis no tarso, não é órgão locomotor e insere-se na mesma área membranosa em que o faz o gnatosoma, lateralmente a este. Consta de seis artículos — coxa, trocânter, femur, geno, tíbia e tarso — apresentando o femur e o tarso, em situação basal, um sulco anular no seu revestimento quitinoso, que os divide em dois pseudoartículos, um proximal, pequeno e de calibre mais reduzido e outro distal, maior. Com exceção da coxa, que tem uma entumescência ventral, e do femur, que é um pouco convexo dorsalmente, os outros artículos são direitos. O tarso é mais longo e delgado, terminando por um tufo de cerdas, de onde se destacam três, mais compridas.

Os três pares restantes, que exercem função locomotora, constituem um grupo aparte em relação ao primeiro par, inserindo-se lateralmente aos escudos ventrais por meio de articulações verdadeiras, proporcionadas pelos forames coxais. Teem o mesmo número de artículos que as pernas I, porem com o tarso provido de um ambúlacro e de um par de garras na extremidade livre. As pernas II e IV são mais grossas e mais longas do que as pernas III.

O ambúlacro (fig. 8) é um pequeno saco membranoso inserido na extremidade distal do tarso, e resolvendo-se distalmente em um lobo ventral, liso, em um par de lóbulos laterais com os lados crenelados, alem de mais cinco lóbulos dorsais, arredondados e foliáceos. O par de garras surge dentre os lóbulos, tendo origem numa base bem esclerosada, onde veem ter os dois ligamentos dos músculos tarsais; a contração destes provoca a contração das garras e o murchamento do ambúlacro pelo escoamento da hemolinfa que o distendia, fechando-se seus lobos sobre as garras recolhidas, de modo a protegê-las completamente. Com o relaxamento dos músculos tarsais as garras tornam a projetar-se distalmente, e o afluxo de hemolinfa ao saco ambulacral infla os lóbu-

los, os quais como que desabrocham à maneira de pétalas ao redor das garras.

A coxa obedece ao mesmo modelo em todas as pernas, sendo a do 2.º par mais robusta. Apresenta ventralmente um par de cerdas, além de dois côndilos, um ventral e outro dorsal, que servem para a articulação do trocanter.

O trocanter II é semelhante ao III, porém maior; ambos teem duas cerdas ventrais e duas laterais. O IV é muito desenvolvido, com as mesmas cerdas assinaladas nos II e III, mas com o bordo anterior convexo e o posterior ligeiramente côncavo, este com um pequenino esporão dirigido para trás.

O femur II é encurvado, com convexidade ventral, apresentando cinco cerdas dorsais, quatro ventrais e duas laterais. Junto à base do artículo há três pequenos sulcos transversais, dispostos na mesma circunferência, com a possivel significação de esboço ou resquício de pseudoarticulação. O femur III é direito e nitidamente dividido por uma falsa articulação em basi e em telofemur, o primeiro com uma cerda ventral apenas, o segundo com uma lateral e quatro dorsais; destas a mais basal tem a forma de lâmina de punhal. O femur IV é mais delgado na base e muito comprido, sendo tambem dividido em dois falsos artículos, dos quais sòmente o telofemur apresenta cerdas, uma ventral, duas laterais e três dorsais, sendo duas destas muito grossas e denticuladas na ponta.

O geno II é ligeiramente recurvado, com convexidade dorsal, apresentando duas cerdas ventrais, três laterais e cinco dorsais; destas, uma subbasal é muito grossa e bàrbelada na extremidade distal. O geno III é direito, com quatro cerdas dorsais, duas laterais e uma ventral. O geno IV é semelhante ao último, mas com uma cerda dorsal a menos.

A tíbia é direita e simples nos três pares; na perna II com duas cerdas ventrais, quatro laterais e cinco dorsais; na III com duas ventrais, duas laterais e três dorsais; na IV com uma ventral, duas laterais e três dorsais.

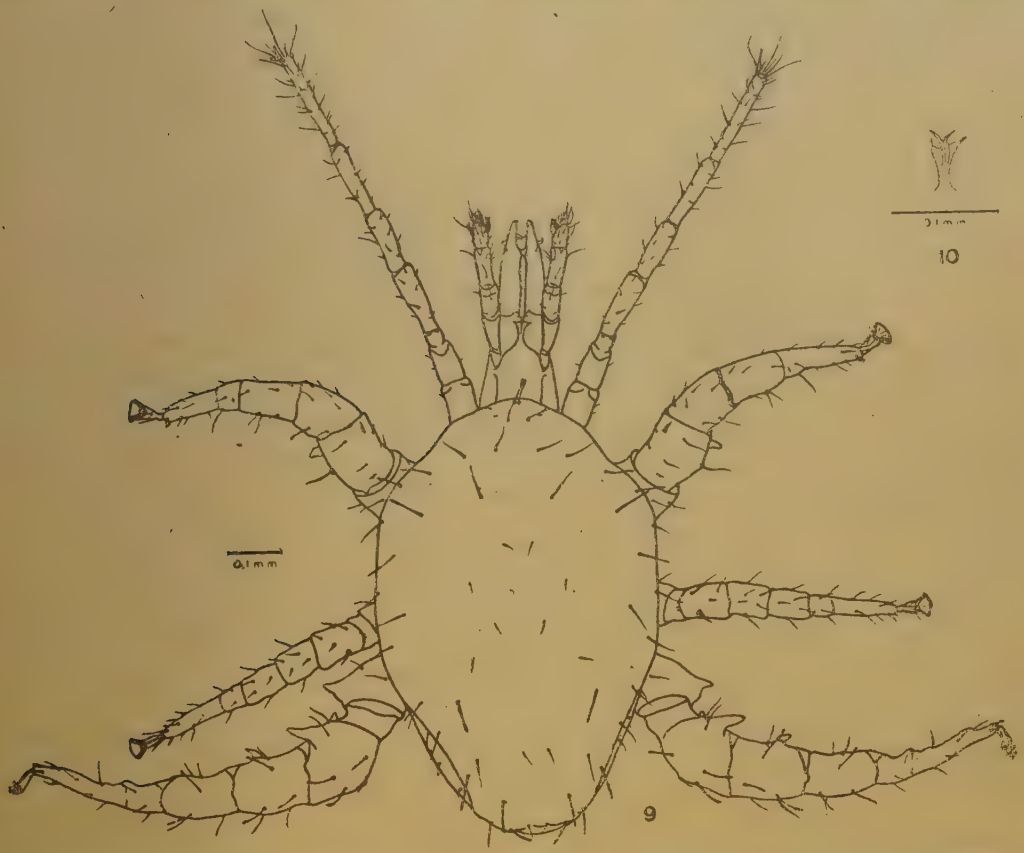
O tarso é o segmento mais longo, delgado e uniforme nas três pernas, sempre dividido em basitarso e telotarso; o basitarso tem duas cerdas laterais e duas dorsais; o telotarso tem cinco dorsais, duas laterais e cinco ventrais, toda grossas e espiniformes, ao passo que ao pé dos ambúlacros tem origem um par de cerdas pequenas e finas.

MACHO
(FIGS. 9-10)

Forma irregularmente hexagonal, com o ângulo mais agudo voltado para trás.

Gnatosoma

Semelhante ao da fêmea, porém menor. Seu carater sexual secundário mais notavel consiste no esporão do dedo movel da quela.



M. muscaedomesticae (SCOPOLI): Macho. Fig. 9 — face dorsal; fig. 10 — epistômio.

Idiosoma

Face dorsal (Fig. 9).

É recoberta pelo escudo dorsal, que tem as seguintes dimensões (N = 20): comprimento — 0,80 ± 0,012 (0,69 — 0,91 mm); largura — 0,50 ± 0,010 (0,42 — 0,61 mm). O escudo dorsal deixa exposta apenas estreitíssima faixa membranosa, lateralmente, perto da extremidade posterior. Implantam-se nele cerca de vinte e oito pares de cerdas, semelhantes às da fêmea e semelhantemente dispostas. As lirifissuras são em número mais reduzido e dificilmente perceptiveis.

As esculturações obedecem ao mesmo modelo das fêmeas, porém muito menos nítidas.

Face ventral

Da coalescência de todos os escudos ventrais assinalados na fêmea, menos os peritremáticos, resulta o único escudo ventral, cujas esculturações são iguais às do escudo dorsal. Conserva todas as cerdas assinaladas nos escudos ventrais da fêmea, acrescidos de mais dois pares, um logo abaixo da inserção da coxa IV e outro pouco mais abaixo ainda.

Junto ao bordo anterior do escudo ventral, em situação mediana, nota-se pequena e estreita faixa mais esclerosada, que delimita com o referido bordo a fenda genital, que dá acesso ao canal que aloja o penis; este é órgão bem esclerosado, tubular, com um estrangulamento subapical que lhe confere perfil espatuliforme.

Pernas

I — muito semelhante à da fêmea, com exceção do tarso, que não é completamente dividido em basi e telotarso, e da coxa, que não possue a entumescência assinalada na fêmea. II — Pouco mais grossa do que na fêmea, com a mesma disposição das cerdas, tendo a mais, porém, um esporão ventral no femur, um tubérculo em cada femur, geno e tíbia, e ainda quatro entumescências no tarso, sempre ventrais. III — A cerda em lâmina de punhal da fêmea é substituida por outra, grossa mas simples; na face ventral do femur e do trocânter aparece um pequenino esporão.

Perna IV — Difere completamente da da fêmea, sendo bem mais grossa e com os artículos recurvados de tal maneira, que sua extensão completa se torna impossivel. O trocanter apresenta no meio da face ventral uma tuberosidade, e ainda na mesma face um discreto esporão apical; o femur tem um grande esporão lateral anterior, com duas cerdas junto à sua implantação, mais um tubérculo lateral posterior, sobre o qual se insere uma cerda, e ainda dois pequenos esporões ventrais; no geno ha tambem um esporão grande, porém menor do que o femural; a tíbia é inerme; o basitarso apresenta uma entumescência apical; no telotarso há duas tuberosidades basais, alem de uma entumescência lateral nos limites do seu terço distal.

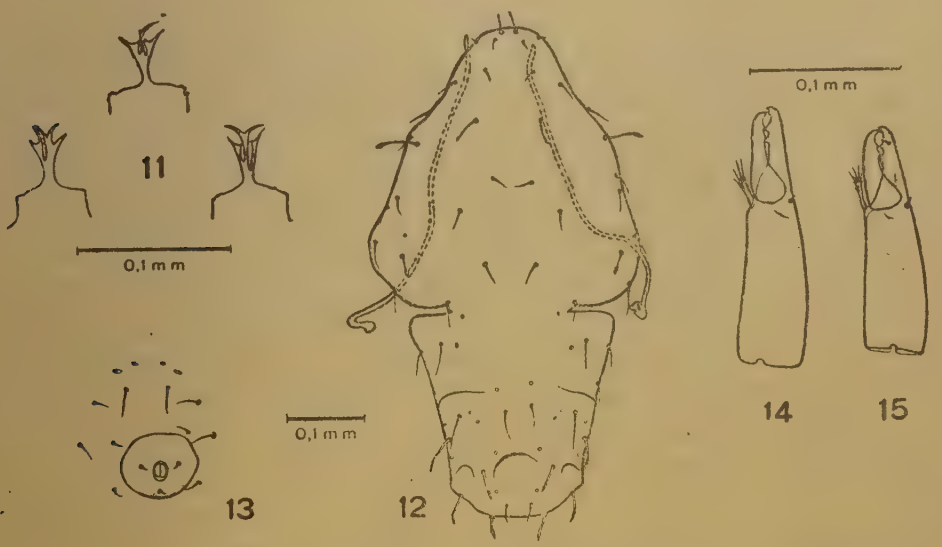
Ante a importância atribuida, em taxonomia, aos acidentes da perna IV, torna-se indispensavel assinalar que seus esporões e tubérculos são susceptiveis de variação na mais ampla escala possivel, não só na forma, como no grau de desenvolvimento e tambem em número.

Assim, pudemos verificar que o grande esporão genual pode apresentar-se reduzido às proporções de um simples tubérculo, e mesmo desaparecer de todo. O grande esporão femural apresentou em um exemplar interessante fenômeno de duplicação, do que resultou o aparecimento de dois esporões geminados, sem prejuizo das dimensões.

DEUTONINFAS

(FIGS. 11-15)

O estudo das deutoninfas permitiu evidenciar nas câmaras de criação a existência de dois agrupamentos, relativos ao tamanho, que se revelaram estatisticamente significantes, constituindo uma típica



M. muscaedomesticae (Scopoli): Deutoninfa. Fig. 11 — epistômios; fig. 12 — escudo dorsal; fig. 13 — escudo anal; fig. 14 — quelícera da ginoninfa; fig. 15 — quelícera da androninfa.

dimegalia deutoninfal, que nos parece ser agora assinalada pela primeira vez, e acompanhada por ligeiro dimorfismo sexual correspondente. Entretanto, sua avaliação exata não é possivel nas dimensões totais do bicho, devido à grande distensibilidade do seu tegumento membranoso. O estudo das dimensões das quelíceras proporcionou-nos os dados necessários para fundamentar devidamente a nossa observação.

O grupo de maior porte é o das deutoninfas que, na ecdise final, se transformarão em fêmeas, e para as quais propomos a denominação de ginoninfas; o outro agrupamento é constituido pelas deutoninfas que, na ecdise seguinte, darão machos, e portanto merecem ser denominadas androninfas.

Ginoninfas (N = 6) : comprimento das quelíceras (fig. 14) — 0,163 ± 0,0006 (0,159 — 0,165 mm) ; comprimento das quelas — 0,058 ± 0,0006 (0,049 — 0,053 mm).

Androninfas (N = 10) : comprimento das quelíceras (fig. 15) — 0,141 ± 0,0013 (0,136 — 0,145 mm) ; comprimento das quelas — 0,050 ± 0,0003 (0,0049 — 0,053 mm).

O esclerosamento das deutoninfas é discreto, de tal modo que seu corpo quasi todo tem côr esbranquiçada, com exceção das pernas IV, dos cornos maxilares e das quelíceras, que exibem tonalidades de amarelo.

Gnatosoma

E' do mesmo tipo que o das fêmeas, guardadas as proporções de tamanho. Tem desenvolvimento maior nas ginoninfas do que nas androninfas, o que pode ser bem avaliado nas dimensões das quelíceras.

Idiosoma

Face dorsal

O escudo dorsal (fig. 12) é único como nos adultos, porem com um par de depressões laterais ao nivel dos estigmas, que assinala sua diferenciação em uma parte anterior, mais extensa, e outra posterior, menor. Tem vinte e sete pares de cerdas, das quais se destacam as duas verticais, quatro umerais, oito posteriores e mais duas situadas pouco adiante do recorte do escudo, que são grandes e barbeladas, ao passo que as restantes são simples.

Face ventral

Os escudos ventrais são reduzidos a um esternal, que se estende ao nivel da inserção da coxa IV, com quatro pares de cerdas, e um anal (fig. 13) grosseiramente circular, com três cerdas ao redor da abertura anal e uma área porosa posteriormente.

O estigma e o peritrema são semelhantes aos da fêmea, porem o escudo peritremático é pouco desenvolvido e independente do dorsal.

O tegumento membranoso que preenche os claros deixados pelos escudos é finamente estriado anteriormente e não só estriado mas tambem mamilado posteriormente. Entre os escudos esternal e anal situam-se quatro pares de cerdas simples, das quais o primeiro par corresponde ao lugar da genitália da fêmea, ao passo que os três pares restantes correspondem ao do seu escudo ventrianal.

Pernas

São semelhantes às da fêmea e revestidas por cerdas em geral simples, com exceção das da perna IV, onde ha algumas barbeladas. Acusam ligeiro dimorfismo sexual: nas ginoninfas as pernas II são ligeiramente mais engrossadas; nas androninfas são mais grossas as pernas II e IV, exibindo estas últimas a mais, no femur, uma tuberosidade correspondente ao grande esporão femural dos machos.

PROTONÍNFA

(FIGS. 16-19)

As dimensões de um exemplar foram: comprimento — 0,534 mm; largura — 0,443 mm.

O esclerosamento é praticamente nulo, a não ser na região posterior do escudo dorsal posterior, a-pesar-das quelíceras serem funcionais.

Gnatosoma

Sua peculiaridade mais notavel neste estádio consiste em o epistômio ter apenas dois braços (fig. 16). Suas dimensões são (N = 10):

comprimento das quelíceras (fig. 17) — 0,119 ± 0,0013 (0,109 — 0,124 mm);

comprimento das quelas — 0,042 ± 0,006 (0,039 — 0,045 mm).

Idiosoma

Face dorsal (Fig. 18).

O dorso é recoberto por dois escudos: um anterior, maior e outro posterior, menor. No escudo anterior existem onze pares de cerdas das quais um único, as cerdas umerais, tem as pontas barbeladas. Dos oito pares de cerdas do escudo posterior, os quatro mais posteriores são barbelados; este último escudo apresenta ainda uma pequena depressão no terço anterior e três depressões maiores no terço médio, estas bem esclerosadas, relativamente, sendo ainda relativamente bem esclerosada sua borda posterior. Ha ainda seis pares de cerdas situadas fora dos escudos dorsais.

Face ventral

Ventralmente existe apenas o escudo anal, com forma aproximadamente triangular, contendo a abertura anal, com as suas três cerdas e uma área porosa. No lugar do escudo esternal encontram-se três pares de cerdas, o mesmo sucedendo no lugar do escudo ventrianal da deutoninfa.

Lateralmente, ao nivel do espaço entre as pernas III e IV estão os estigmas (fig. 19), que se abrem no topo de uma pequena elevação, e que conduzem a um pequeníssimo tubo, com a significação de esboço de um perítrema.

Pernas

São semelhantes às das ginoninfas.

PROTERONINFA (*)

(FIGS. 20-22)

As dimensões de um exemplar em ecdise foram: comprimento — 443 mm; largura — 0,345 mm.

Gnatosoma

Apresenta-se bem simplificado, com as quelas bastante reduzidas, sendo curto o dedo movel, ao passo que o dedo fixo é representado apenas por um pequeno tubérculo (fig. 20). A cerda da base do quinto artículo palpal é apenas bifurcada, quando se apresentava trifurcada em todos os outros estádios; a cerda apical do mesmo artículo é muito pequena e assemelha-se mais a uma papila. O epistômio tambem está reduzido a apenas dois lobos foliáceos (fig. 21).

Idiosoma

Face dorsal

Desprovida de escudos, tem catorze pares de cerdas simples.

Face ventral (Fig. 22)

Desprovida de escudos e de estigmas tem, alem das três cerdas perianais, mais cinco pares distribuidos simetricamente.

Pernas

São em número de três pares, dos quais só os dois últimos são ambulatórios, todos revestidos de cerdas simples.

Ovo

O ovo recemposto já encerra uma proteroninfa completamente desenvolvida. Sua forma é elipsoide e tem as seguintes dimensões: 0,394 mm de comprimento por 0,287 mm de largura.

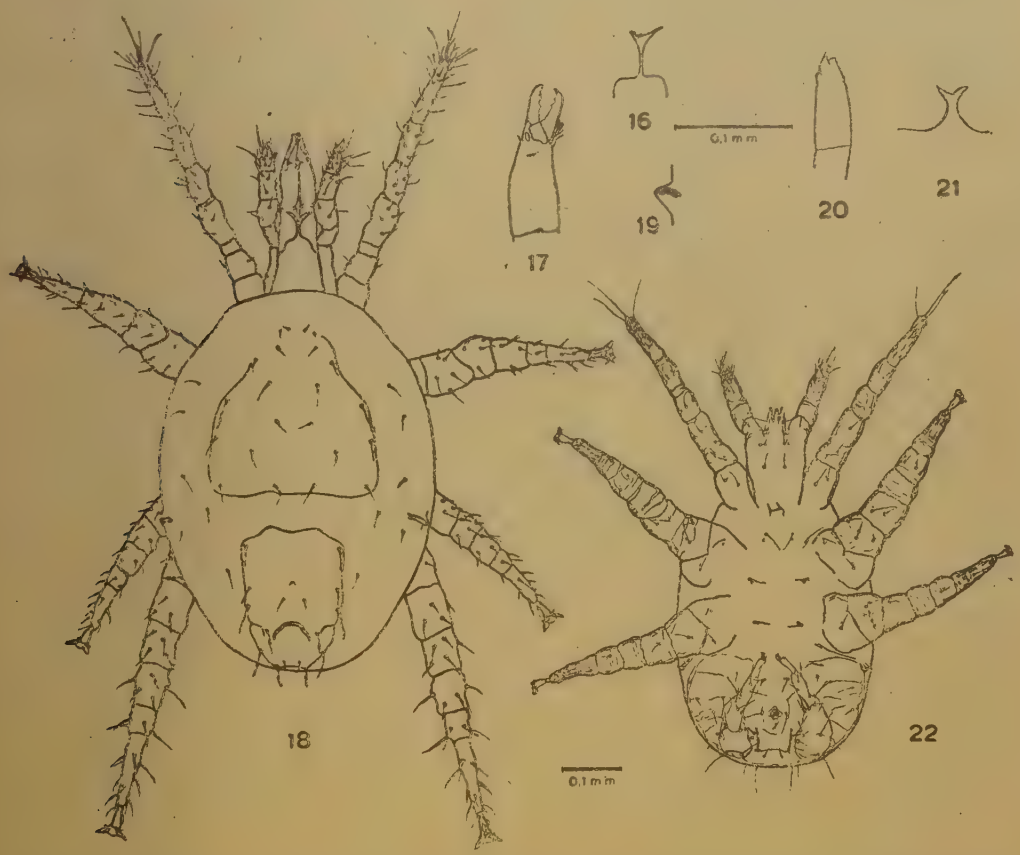
BIONOMIA

Este assunto está sendo estudado em seus pormenores, afim-de se obter idéia mais clara quanto ao papel que representa esta espécie, assim como outras que lhe são afins, no controle da mosca doméstica.

(*) Em reunião de 10 de janeiro de 1945 o "Clube Zoológico do Brasil" aprovou e recomendou o uso do termo proteroninfa para designar o estádio ninfal hexápodo que resulta da eclosão da maioria dos ovos dos *Acarina* DE GEER, conforme proposta de C. PEREIRA e M. P. DE CASTRO, relatores do tema: "Nomenclatura dos estádios juvenís dos insetos de metamorfose inexistente ou incompleta e dos aracnídeos".

Entretanto já é possivel adiantar algumas aquisições de carater mais geral sobre seu ciclo evolutivo.

Unica fase da espécie que viaja em moscas, as fêmeas, depois de abandonado seu veículo, somente são capazes de iniciar a postura de ovos depois de efetuarem sua primeira refeição. Caso contrário poderão permanecer vários dias em observação, sem pôr um único ovo.



M. muscaedomesticae (Scopoli): Protoninfa (figs. 16-19). Fig. 16 — epistômio; fig. 17 — quelícera; fig. 18 — face dorsal; fig. 19 — estigma. Proteroninfa (figs. 20-22). Fig. 20 — quelícera; fig. 21 — epistômio; fig. 22 — face ventral.

Quando se começa a criação por uma fêmea recemchegada, logo no dia seguinte ao da primeira refeição já é posto o primeiro ovo, ao qual se segue, diariamente, um ovo, com ritmo bem regular, que depende de regularidade com que é mantido o abastecimento alimentar.

O período de incubação dos ovos é curto, não costumando ir alem de 5-6 horas, dando-se em seguida a eclosão, com emergência das proteroninfas.

As proteroninfas teem existência tambem muito curta, que não vai alem do prazo de incubação dos ovos. Assim, uma proteroninfa que emergiu de manhã efetuará sua ecdise à tarde do mesmo dia, transformando-se na protoninfa.

Do ponto de vista ecológico, o carater mais interessante das proteroninfas reside em elas não se alimentarem, ao contrário do que acontece em outros grupos, como por exemplo entre os carrapatos. Este fato parece indicativo de uma tendência para abreviar o ciclo evolutivo, pois evidentemente a existência do estádio proteroninfal é inteiramente despido de qualquer significação ecológica, representando apenas maior precocidade no tempo de eclosão dos ovos.

As protoninfas permanecem nesse estádio por cerca de um dia, alimentando-se amplamente, até atingirem o máximo de turgência, quando sofrem outra ecdise, a segunda do ciclo, da qual emergem as deutoninfas.

As deutoninfas permanecem como tais tambem apenas por cerca de um dia. No momento da emergência são, praticamente, todas do mesmo tamanho. Entretanto diferencia-se logo um grupo delas, que se alimenta com maior voracidade, de tal modo que o tegumento membranoso lateral e posterior do idiosoma aparece mais distendido, conferindo-lhe maiores dimensões totais, alem de um rebordo posterior mais arredondado; na ecdise final (terceira do ciclo) delas emergirão fêmeas, correspondendo portanto ao que denominamos ginoninfas quando descrevemos a espécie. O outro grupo, que se alimenta mais discretamente e permanece portanto menos túrgido, alem de ter o contorno posterior mais afilado, corresponde ao que denominamos na mesma oportunidade androninfas, pois na ecdise final darão emergência a machos. A diferença de forma do contorno posterior entre as ginoninfas e as androninfas assume o máximo de intensidade ao aproximar-se o momento da ecdise, e apenas representa a tradução morfológica grosseira da forma do estádio seguinte já contida no interior das deutoninfas.

Finalmente, após a terceira ecdise do ciclo evolutivo, as androninfas transformam-se em machos e as ginoninfas em fêmeas. Ambas as fases do estádio adulto se alimentam, embora as fêmeas mais do que os machos. Por outro lado, a longevidade das fêmeas tambem é maior do que a dos machos, de tal modo que, em população confinada, por ocasião de uma crise alimentar que impeça o advento

de novos indivíduos, somente sobreviverão as fêmeas, o que foi um dos esteios da concepção de partenogênese dos autores antigos, quanto a este grupo, já exposta na introdução e discussão da nomenclatura desta espécie.

Em todas as fases do ciclo evolutivo as ecdises não são precedidas de um periodo de imobilidade nem, sequer, de abstenção alimentar. O revestimento quitinoso do estádio que vai mudar de pele permanece enluvando o corpo e todos os apêndices do estádio seguinte, mantendo-se o conjunto em plena atividade, de tal modo que o fenômeno da ecdise propriamente dita, que tem a duração de cerca de uma hora, consiste num simples desenluvamento do estádio ulterior, que abandona a exúvia através de uma fenda sagital anterior que se abre no antigo idiosoma.

ECOLOGIA

A espécie é fimícola, realizando todo seu ciclo evolutivo nas esterqueiras, principalmente de estrume de cavalo.

As proteroninfas e as ninfas são lucífugas, procurando abrigar-se sob os diversos esconderijos que encontram, de modo tal que, durante o dia, torna-se necessário remexer a esterqueira afim-de encontrá-las. Os adultos, ao contrário, passeiam livremente pela superfície sendo assim quasi as únicas fases do bicho a serem encontradas num exame mais perfuntório.

Todas as suas fases evolutivas, exceto as proteroninfas, que não se alimentam, teem o mesmo regime alimentar, demonstrando grande avidez pelos ovos de moscas, que sugam com notavel eficiência.

Em termos de destruição dos ovos de moscas, os resultados vão muito alem do que seria de esperar em relação unicamente ás suas exigências alimentares, pois é muito grande o número de ovos que é picado com volubilidade ou apenas parcialmente sugado, o que é o bastante para induzí-los à deterioração, que se traduz logo pelo escurecimento da sua côr, inicialmente esbranquiçada. Estão sendo colhidos os dados necessários para a avaliação da importância da espécie no controle da mosca nas condições naturais, pois o exame da literatura sobre o assunto revelou que este importante aspecto do problema parece completamente desconhecido, e mesmo não suspeitado.

Pelo visto, esta espécie é tipicamente predadora, prefencialmente de ovos de moscas, eventualmente de larvas de moscas no 1.º estádio, o que nos pareceu muito esporádico e portanto negligivel.

Outro aspecto interessante do seu comportamento ecológico é o fato das fêmeas da espécie exercerem f o r e s e, tendo as moscas por veículo habitual; como já vimos, é esta a peculiaridade dominante na sua ecologia havendo mesmo prestado os melhores serviços no chamar a atenção de vários pesquisadores acerca da sua existência.

Este fenômeno, que já havia sido interpretado corretamente por autores mais antigos, foi mais tarde diversas vezes considerado, indevidamente, como caso de parasitismo, pela suposição de que o ácaro estaria agredindo a mosca no decorrer da viagem, quando apenas permanece seguro, por meio das quelas, às cerdas do veículo.

O número de ácaros que viaja em cada mosca varia habitualmente de um a três indivíduos, raramente mais, o que parece ser bem suportado pelo hospedeiro, que não apresenta maior sofrimento por isso. Parece haver decidida preferência pelo abdome da mosca como lugar de eleição para a viagem.

Na questão da forese deste ácaro ha uma particularidade cuja significação não pode ainda ser convenientemente avaliada: a de que suas fêmeas viajem tambem em coleópteros coprófagos. As informações positivas a tal respeito são, na totalidade, de autores do século passado. No século atual só colhemos referências á viagem em moscas.

Nossa experiência no assunto ainda não é de molde a permitir resolvê-lo em definitivo. Entretanto, achamos oportuno assinalar que, tanto nas condições naturais como em laboratório, a mosca doméstica revelou-se o veículo ideal da espécie. Por outro lado, as tentativas de fazê-la viajar em *Aphodius* sp. deram sempre resultados negativos. Não conseguimos tambem coletá-la nenhuma vez viajando naturalmente em coleópteros coprófagos.

Entretanto, outra espécie fimícola afim desta, e ainda em estudo, recusou-se a viajar na mosca doméstica, dando preferência à mesma espécie de coleóptero coprófago que não fôra aceita como veículo pelo *Macrocheles muscaedomesticae*, o que permite excluir a possibilidade de que algum erro de técnica tivesse prejudicado os resultados da experiência.

Elaboramos, por ordem alfabética, uma lista dos hospedeiros da espécie até hoje assinalados pela literatura, cada um precedido do nome do autor que parece tê-lo referido pela primeira vez.

RASPAIL (1843) . . . *Aphodius subterraneus* L. (Coleoptera)
TROJAN (1908) . . . *Calliphora vomitoria* L. (Diptera)
KRAMER (1876) . . . *Geotrupes stercorarius* L. (Coleoptera)
BERLESE (1882) . . . *Muscina stabulans* FALLEN (Diptera)
DE LA HIRE (1730) . . *Musca domestica* L. (Diptera)
? . . . . . *Ontophagus* sp., *apud* LEONARDI (1900). (Coleoptera)
? . . . . . *Scarabeus* sp., *apud* LEONARDI (1900). (Coleoptera)
WEISS (1915). . . . *Scatophaga stercororia* L. (Diptera)
? . . . . . *Silpha obscura* L., *apud* LEONARDI (1900). (Coleoptera)
KOCH (1839) . . . . *Staphylinus olens* MUELLER. (Coleoptera)

CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF THE TYPE SPECIES OF *MACROCHELES* LATR. (ACARINA): *M. MUSCAEDOMESTICAE* (SCOPOLI, 1772) *EMEND.*

Abstract

A revision of the literature on the name of the house-fly traveller macrochelid mite is made and a careful description of all its instars, based on their culture upon house-fly eggs.

The species reveals a deutonymphal dimegaly, correlated with slight sexual dimorphism, which enabled their splitting in "andronymphs", that is, deutonymphs to be transformed in males and "gynonymphs", which produces the females. The protonymphs were uniform.

For the first instar the designation "proteronymph" is adopted, instead of the very commonly used but also very misleading word "larva".

A short account is also given of the leading bionomical and ecological features of the species, which at all instars but the first pray actively on house-fly eggs, thus exerting a very definite role on the control of the flies.

The proteronymphs do not feed at all.

BIBLIOGRAFIA

BALZAN, A. et A. BERLESE — 1888 — Acari Austro-Americani. Manipulus primus. *Bulletino della Societá Entomologica Italiana*, **20**: 171-222.

BANKS, N. — 1906 — A Revision of the Tyroglyphidae of the United States. *U. S. Department of Agriculture*, Bureau of Entomology. Technical Series, **13**: 1-34.

BERLESE, A. — 1882 *a* — Il polimorfismo e la partenogenese di alcuni Acari (Gamasidi). *Bulletino della Societá Entomologica Italiana*, 14: 88-141, est. I.

BERLESE, A. — 1882 *b* — Polymorphisme et Parthénogénèse de quelques Acariens (Gamasides). *Archives Italiennes de Biologie*, 2: 108-129, 1 est.

BERLESE, A. — 1885 — Acarorum systematis Specimen. *Bulletino della Societá Entomologica Italiana*, 17: 121-135.

BERLESE, A. — 1889 — Acari, Myriapoda & (Pseudo) Scorpiones hucusque in Italia reperta, 52: (1), (3), (4), (5), (6).

BERLESE, A. — 1904 — Spicilegia Zoologica. Acari nuovi. Manipulus secundus. *Redia*, 1: (2), 258-280.

BERLESE, A. — 1918 — Centuria quarta di Acari nuovi. *Ibidem*, 13: 115-192.

BERLESE, A. — 1921 — Acari, Myriapoda et Pseudoscorpiones hucusque in Italia reperta. I — Indice sinonimico dei generi e delle specie illustrate nei fascicoli 1 a 101. II — Data di publicazione dei singoli fascicoli. *Ibidem*, 14: 77-105.

CANESTRINI, G. — 1881 — Osservazioni intorno al genere Gamasus. *Atti del Reale Instituto Veneto di Scienze, Lettere ed Arti*, 7, serie V. *Apud* G. et R. Canestrini (1882).

CANESTRINI, G. — 1887 — Viaggio di Leonardo Fea in Birmania e regioni vicine. LXXIX — Contribuzione alla conoscenza degli acaroidei della Birmania. *Annali del Museo Civico di Storia Naturale di Genova*, serie 2.ª, 8: (38), 417-422.

CANESTRINI, G. et R. CANESTRINI — 1882 — I Gamasi Italiani. *Atti della Società Veneto-Trentina di Scienze Naturali*, 8: 3-82.

CANESTRINI, G. et FANZAGO — 1877 — Acari Italiani. *Atti del Reale Instituto Veneto de Scienze, Lettere ed Art*, serie V, 4. *Apud* G. et R. Canestrini (1882).

CANESTRINI, R. — 1881 — Contribuzione allo studio degli acari parassiti degli Insetti. *Atti della Società Veneto-Trentina di Scienze Naturali*, 7: (2). *Apud* G. et R. Canestrini, (1882).

CHAMBERLIN, W. J. — 1941 — Entomological Nomenclature and Literature. Edwards Brothers, Inc., Ann Arbor, IX + 103.

DUGÈS, A. — 1834 — Remarques sur la famille des Gamases (3e. famille de l'ordre). Troisième Mémoire, Article prémier. *Annales des Sciences Naturelles*, Séconde Série, Zoologie, 2: 18-36.

EDWARDS, H. M. — 1838 — *In* Lamarck, J. B. P. A. de M. — Histoire Naturelle des Animaux sans Vertèbres, 2e. ed., 5: 56-94. *Apud* Oudemans (1937).

EWING, H. E. — 1913 — A New Parasite of the House-fly (Acarina, Gamasoidea). *Entomological News*, 24: 452-456 + est. XVII.

FALCONER, W. — 1923 — Two British mites new to science and a new subgenus of Macrocheles Latr. *Naturalist*, London, 151-152. *Apud* Hull (1925).

FOÁ, A. — 1900 — Esistono il polimorfismo e la partenogenesi nei Gamasidi? *Bulletino della Società Entomologica Italiana*, 32: 121-149.

GUÉRIN-MÉNEVILLE, F. E. — 1826 — Macrochèle, Microphthires, Mite. *In* Dictionaire Classe Histoire Naturelle, 10:. *Apud* Oudemans (1937).

HALBERT, J. N. — 1915 — Acarinida, II — Terrestrial and marine Acarina. *In* Clare Island Survey, Part 39, II. *Proceedings of the Royal Irish Academy*, 31: 45-136 + pl. IV-VIII.

HALLER, G. — 1882 — Beitrag zur Kenntniss der Milbenfauna Wuerthemb. *Jahr. Ver. Wuerth.*, 38. *Apud* Leonardi (1900).

HERMANN, J. F. — 1804 — Mémoire Apterologique. Strassbourg. *Apud* Oudemans (1929).

HIRE, DE LA — 1730 — Description d'un Insecte qui s'attache aux Mouches. *Mémoire Academie Royale des Sciences*, Paris, 10. *Apud* Oudemans (1926).

HULL, J. E. — 1925 — Acari of the family G a m a s i d a e : new and rare British species. *Annals and Magazin of Natural History*, serie 9, 15: 201-219 + est. XVI-XIX.

KOCH, C. L. — 1839 — Deutsche Crustacea, Myriapoda und Arachnida. Regensburg. *Apud* Oudemans (1937).

KOLENATI, F. A. — 1858 — *Wiener Entomologische Monatsschrift*, 2: (3). *Apud* Oudemans (1914).

KRAMER, P. — 1876 — Zur Naturgeschichte einiger Gattungen aus der Familie der Gamasiden. *Archiv fuer Naturgeschichte*, 42: (1), 46-105.

LATREILLE, P. A. — 1806 — Genera Crustaceorum et Insectorum. *Apud* Oudemans (1937).

LATREILLE, P. A. — 1825 — Familles naturelles du Règne animale, Paris. *Apud* Oudemans (1937).

LATREILLE, P. A. — 1829 — Des animaux articulés pourvus de pieds articulés en général. Les Arachnides. *In* Cuvier, G. L. C. F. D. — *Le Règne Animal*, Paris. *Apud* Oudemans (1937).

LEACH, W. E. — 1819 — Acari. *In* Samouelle, G. — The Entmologist's useful Compendium, London. *Apud* Oudemans (1937).

LEONARDI, G. — 1900 — Storia Naturale degli Acari Insetticoli. *Bulletino della Societá Entomologica Italiana*, 32: 1-76.

LINNEUS, C. — 1758 — Systema naturae. Regnum animale. Editio decima. Cura Societatis Zoologicae Germanicae Iterum Edita, 1894. Sumptibus Guilielmi Engelmann, Lipsiae, 824 + III.

MÉGNIN, M. — 1875 — Sur l'organisation et la classification naturelle des Acariens de la famille des Gamasides (P. Gerv.). *Comptes Rendues Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences*, 80: 1335-1338.

MUELLER, J. — 1860 — Insekten Epizoën der Mährischen Fauna. *Jahreshefte* (pro 1859) der Naturwissenschaft. Sektion der Mähr. Schles. Gesellschaft zur Befoerderung des Ackerbaues, der Natur- und Landeskunde, Bruenn, 157-184 + 4 est. *Apud* Leonardi (1900).

OUDEMANS, A. C. — 1900 *a* — Further notes on acari. *Tijdschrift voor Entomologie*, 43: 109-128.

OUDEMANS, A. C. — 1900 *b* — Bemerkungen ueber Sanremeser Acari. *Ibidem*, 43: 129-139 + est. VII e VIII.

OUDEMANS, A. C. — 1902 *a* — Notes on Acari. III. *Tijdschrift der Nederlandsche Dierkundize Vereeniging*, serie 2, 7: 50-87.

OUDEMANS, A. C. — 1902 *b* — Notes on Acari. IV. *Ibidem*, 7: 276-310 + est. VIII-X.

OUDEMANS, A. C. — 1904 — Notes on Acari. XI. *Tijdschrift voor Entomologie*, 46: 93-134, + est. XI-XIII.

OUDEMANS, A. C. — 1913 — Acarologische Aanteekeningen. XLIX. *Entomologische Berichte*, Gravenhage, 4: (73) 2-18.

OUDEMANS, A. C. — 1914 *a* — Acarologische Aanteekeningen. LII. *Ibidem*, 4: (76) 65-73.

OUDEMANS, A. C. — 1914 *b* — Notes of Acari. *Tijdschrift voor Entomologie*, 57. *Apud* Oudemans (1915).

OUDEMANS, A. C. — 1915 — Acarologische Aanteekeningen. LVI. *Entomologische Berichten*, Gravenhage, 4: (83), 180-188.

OUDEMANS, A. C. — 1926 — Kritisch Historisch Overzicht der Acarologie. Eerste Gedeelte, 850 v. C. tot 1758. *Tijdschrift voor Entomologie*, 69, Supplement, VIII + 500.

OUDEMANS, A. C. — 1928 — Acarologische Aanteekeningen. XCV. *Entomologische Berichten*, Gravenhage, 7: (165), 393-399.

OUDEMANS, A. C. — 1929 — Kritisch Historisch Overzicht der Acarologie. Tweede Gedeelte, 1759 — 1804. *Tijdschrift voor Entomologie*, 72: Supplement XVII + 1097.

OUDEMANS, A. C. — 1931 — Acarologische Aanteekeningen. CIX. *Entomologische Berichten*, Gravenhage, 8: (180), 272-280.

OUDEMANS, A. C. — 1936 — Kritisch Historisch Overzicht der Acarologie. Deerde Gedeelte, *A.*, E. J. Brill, Leiden, XX + 430.

OUDEMANS, A. C. — 1937 — *Idem.* Deerde Gedeelte, *G. Ibidem*, 2.735-3.379

OUDEMANS, A. C. — 1938 — Nieuwe vondsten op het gebied der Systemateek en der Nomenclatur der Acari. II. *Tijdschrift voor Entomologie*, 81, Verslag, LXX — LXXX.

PEREIRA, C. e M. P. DE CASTRO — 1943 — Um método de impregnação argêntica para o estudo da morfologia interna de invertebrados microscópicos em toto-montagem. *Arq. Inst. Biológico*, S. Paulo, 14: 207-212 + 2 pls.

PEREIRA, C. e M. P. DE CASTRO — 1945 — Cultura de ácaros e de alguns outros aracnídeos predadores. Livro Comemorativo de Romualdo Ferreira de Almeida. (No prelo).

RASPAIL, F. V. — 1843 — Histoire Naturelle de la Santé. 2 vols., Paris. *Apud* Oudemans (1937).

SCOPOLI, J. A. — 1763 — Dictionaire portative d'histoire naturelle, etc. Liège, 2 vols. *Apud* Oudemans, (1929).

SCOPOLI, J. A. — 1772 — Annus V. historico naturalis, Lipsiae. *Apud* Oudemans (1929).

SELLNICK, M. — 1931 — Zoologische Forschungsreise nach den Jonischen Inseln und den Pelopones von Max Baer, Wien. Acari. *Sitzungsberichte Akademie Wissenschaft Wien*, serie 1, 140: (9-10), 693-776.

SELLNICK, M. — 1941 — Einige Milbenarten C. L. Koch's. *Zoologischer Anzeiger*, 133: (7-8), 146-155.

SULZER, J. H. — 1776 — Abgekuerzte Geschichte der Insecten. Winterthur.. *Apud* Oudemans (1929).

TROJAN, E. — 1908 — *Holostaspis sita*, eine neue Acarine. *Archiv fuer Naturgeschichte*, 74: (1), 1-12 + est. I.

VITZTHUM, H. G. — 1930 — Acarologische Beobachtungen. (14 Reihe). *Zoologische Jahrbuecher*, Abteilung fuer Systhematic, 281-350.

WEISS, H. B. — 1915 — Preliminary List of New Jersey Acarina. *Entomological News*, 26: (4), 149-152.

———o———

SOBRE UM GINANDROMORFO DE "RHIPICEPHALUS SANGUINEUS LATR., 1804"

POR

C. Pereira e M. P. de Castro

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 2 figuras no texto

INTRODUÇÃO

Parece que até o presente só haviam sido assinaladas nesta espécie cosmopolita anomalias não ligadas ao mecanismo de determinação do sexo, tais como a duplicação da borda posterior do idiosoma, por WARBURTON e NUTTALL (1909), a existência de ligeira assimetria, por NUTTALL (1914), a ausência da perna I direita, por NUTTALL (1914) e por SHARIF (1930), todas observadas em espécimes machos.

Em relação às anomalias da determinação do sexo nos carrapatos, as mais interessantes são as relativas ao ginandromorfismo, a cujo respeito pudemos reunir os dados bibliográficos referentes aos onze casos já conhecidos, acrescidos do estudado no presente trabalho:

1 — *Amblyomma neumanni* RIBAGA, 1902; descr. e ilustr.: JOAN (1919).

2 — *Amblyomma variegatum* (FABRICIUS, 1798); refer.: BRUMPT (1922); ilustr.: BRUMPT (1927); descr.: BRUMPT (1934).

3 — *Rhipicephalus bursa* CANESTRINI *et* FANZAGO, 1878; ref.: BRUMPT (1927); descr. e ilustr.: BRUMPT (1934).

4 — *Hyalommina isaaci* SHARIF, 1928; descr. e ilustr.: SHARIF (1930); interpr.: SCHULZE (1937).

5 — *Hyalomma marginatum balcanicum* SCHULZE *et* SCHLOTTKE, 1929; ref. e ilustr.: SCHULZE *in* VITZTHUM (1931); descr. e ilustr.: SCHULZE (1933).

6 — *Amblyomma scutatum* NEUMMANN, 1899; descr. e ilustr.: SCHULZE (1933).

7 — *Amblyomma dissimile* KOCH, 1844; descr. e ilustr.: BRUMPT (1934).

8 — *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787); descr. e ilustr.: FONSECA (1935).

9 — *Hyalomma detritum damascenium* SCHULZE *et* SCHLOTTKE, 1929; descr. e ilustr.: SCHULZE (1936).

10 — *Uroboophilus cyclops* MINNING, 1934; descr. e ilustr.: SCHULZE (1936).

11 — *Ixodes dentatus* MARX *in* NEUMANN, 1899; descr. e ilustr.: SMITH (1942).

12 — *Rhipicephalus sanguineus* LATREILLE, 1829; descr. e ilustr.: neste trabalho.

MATERIAL E TÉCNICA

O exemplar que é objeto deste trabalho foi colhido num cão em Bebedouro (Estado de São Paulo — Brasil), por A. RUFFATO, em 12/9/945. Manteve-se vivo até 19/10/945, e como durante esse lapso de tempo não puzesse um único ovo, a-pesar-de haver sugado, embora discretamente, foi então fixado e diafanizado para o estudo da sua morfologia externa.

DESCRIÇÃO

Trata-se de uma fêmea que exibe algumas áreas masculinas relativamente pequenas, representadas por zonas fortemente esclerosadas, que se insulam em tecido feminino constituido por tegumento membranoso.

Na face dorsal (fig. 1) há uma grande zona esclerosada, à direita e posteriormente, que forma cinco festões masculinos, separados em um grupo de dois e outro de três por intermédio de uma área feminina relativamente pequena. Além desta, há várias outras zonas pequenas e esparsas, uma das quais, situada logo abaixo do olho esquerdo, se funde com o escudo dorsal feminino.

O gnatosoma é todo feminino, com exceção da área porosa direita, que é muito reduzida, e portanto de carater masculino.

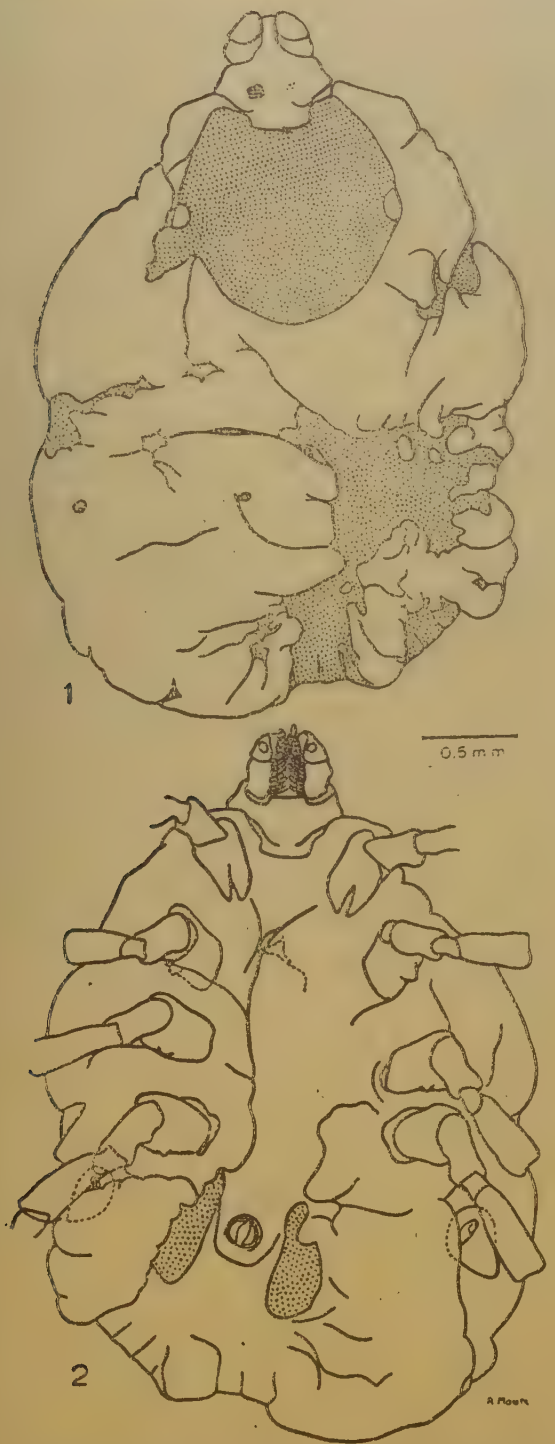
Na face ventral (fig. 2) a zona masculina correspondente à grande zona dorsal está na região anal, onde encontramos por isso caracteres nitidamente masculinos, como é o caso das placas adanais. A abertura genital feminina encontrava-se atrofiada, motivo pelo qual, provavelmente, não nos foi possivel conseguir que desovasse.

Todo o restante da morfologia externa apresenta caracteres tipicamente femininos.

DISCUSSÃO

O ginandromorfismo nos carrapatos é fenômeno bem raro, contando até agora apenas observações esporádicas, pois todas as tentativas feitas para se obterem descendentes dos indivíduos anômalos teem dado resultados negativos, o que dificulta o tratamento genético do assunto.

SCHULZE (1937), o único autor a discutir o problema e a procurar um mecanismo explicativo para tal tipo de anomalia, admitiu



Rhipicephalus sanguineus LATR., 1804. Ginandromorfo. Fig. 1 — face dorsal. Fig. 2 — face ventral. (As áreas ponteadas representam as zonas mais esclerosadas, a saber: escudo dorsal feminino, placas adanais masculinas, e trechos do escudo dorsal masculino.)

que ela fosse conseqüência da fusão de dois ovocitos fertilizados independentemente, o que tanto poderia resultar na constituição de monstros duplos como na de ginandromorfos.

Entretanto, si os primeiros casos de ginandromorfismo permitiam pensar num mecanismo explicativo desse tipo, muito embora não o exigissem, pois as ocorrências até então conhecidas correspondiam a pouco mais ou pouco menos da metade lateral para cada fenotipo sexual do indivíduo, o mesmo não acontece agora, com o maior enriquecimento do material bibliográfico.

Documenta a existência de heterogametismo masculino nos carrapatos, além das observações citológicas de OPPERMANN (1935) em *Argas reflexus* (FABRICIUS, 1794), a ocorrência de partenogênese telítoca em *Amblyomma rotundatum* C. L. KOCH, como foi demonstrado por ARAGÃO (1912).

Por outro lado, os doze casos que até o momento se conhecem, do fenômeno, permitem reconhecer sempre um predomínio, por ligeiro que seja, das áreas femininas do corpo sobre as masculinas, e mesmo a simples redução destas — como ocorreu no material de SHARIF (1930), de SCHULZE (1936) e no atual — a um mosaico de revestimento masculino em organismo tipicamente feminino.

Portanto, em face do que se conhece até agora no assunto, as manifestações de ginandromorfismo nos carrapatos parecem incidir exclusivamente no sexo homogamético, nos mesmos moldes do que foi bem verificado no gênero *Drosophila* FALLÉN, 1823 a partir do trabalho básico de MORGAN *et* BRIDGES (1919) *apud* WADDINGTON (1919).

Assim, parece-nos supérfluo apelar para a hipótese aventada por SCHULZE (1937), possivel mas pouco provavel, quando dispomos de um mecanismo explicativo já tão bem demonstrado em *Drosophila* para fenômeno da mesma ordem, cujas manifestações se superpõem muito exatamente ao que acontece nos carrapatos: o aparecimento de mosaicos cromosômicos em virtude de um fenômeno análogo à não disjunção meiótica ocorrendo com os alosomas em qualquer das mitoses somáticas, no decorrer do desenvolvimento do indivíduo.

Tal tipo de acidente cromosômico redundaria na possibilidade de uma célula diplo-X vir a perder um cromosoma X, de modo a tornar-se o ponto de partida de uma linhagem de células haplo-X. Quando a ocorrência deste acidente for muito precoce, nas primeiras mitoses de segmentação, o ginandromorfo resultante terá cerca de metade do corpo masculina e a outra feminina, o que parece mais freqüênte nos carrapatos, ainda do mesmo modo que para *Drosophila*,

como STURTEVANT (1929) demonstrou para esta categoria de dípteros. Quanto mais tardio for o acidente, tanto mais restrita será a área masculinizada, como ocorreu no material de SHARIF (1930). A repetição do fenômeno no mesmo indivíduo resultará num mosaicismo típico, como deverá ter acontecido no caso de SCHULZE (1937) e no nosso também.

A confirmação desta hipótese virá demonstrar que, tambem nos carrapatos, como já havia sido comprovado nos insetos, cada célula desenvolve seus caracteres na dependência apenas da sua constituição genética, sem sofrer a inter-ação dos tecidos vizinhos, embora sejam estes formados por células possuidoras de um equipamento cromosômico diverso.

ON A GYNANDROMORPH OF *RHIPICEPHALUS SANGUINEUS* LATR., 1804

Abstract

The anomalous specimen is described and a brief reference is made to all other known gynandromorph ticks.

The claims of Schulze on the fusion of ovocytes are discussed, the assigned evidence of the male heterogametism in the ticks and the occurrence of gynandromorphs only in the females are emphasised.

The phenomenon then becomes comparable to that occurring in the genus Drosophila and, on these grounds, the same mechanism of the haplo-X cells formation, already proved valid for these flies, is tentatively applied to the ticks.

BIBLIOGRAFIA

ARAGÃO, H. DE B. — 1912 — Contribuição para a systematica e biologia dos Ixodidos. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 4: 96-119.

BRUMPT, E. — 1922 — Précis de Parasitologie, 3e. édition, Masson et Cie., Paris, XV + 1.216.

BRUMPT, E. — 1927 — *Idem, Ibidem*, VIII + 1.452, 4e. édition.

BRUMPT, E. — 1934 — Le gynandromorphisme chez les ixodines. Un curieux cas obtenu dans un élevage d'Amblyomma dissimile. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 12: 98-104.

FONSECA, F. DA — 1935 — Gynandromorphismo em Amblyomma cajennense (FABR., 1787). *Memorias do Instituto Butantan*. 10: 1-5.

JOAN, T. — 1919 — Caso de ginandromorfismo en una garrapata (Amblyomma neumanni RIB.). *Prim. Reun. Nac. Arg. Cienc. Nat.*, Buenos Aires (1916), 421-426, *apud* BRUMPT (1934).

MORGAN, T. H. and C. B. BRIDGES — 1919 — The origins of gynandromorphs. *Carnegie Institute Publ., 278 apud* Waddington (1939).

OPPERMANN, E. — 1935 — Die Entstehung der Riesenspermien von Argas columbarum (SHAW) (reflexus F.). *Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschungen*, 37: 538-560.

SCHULZE, P. — 1933 — Über Zeckengynander. *Zeitschrift für Morphologie und Oekologie der Tiere*, 26. *apud* SCHULZE (1936).

SCHULZE, P. — 1936 — Ein bemerkenswerter Gynander der Zecke Hyalomma detritum damascenium P. SCH. u. SCHL., 1929. *Sitzungsberichte und Abhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft zu Rostock*, 3: (6) 83-88.

SCHULZE, P. — 1937 — Ein anscheinend durch Eiverschmelzung entstandener Gynander der Zecke Uroboophilus cyclops MINNING, 1934. *Zoologischer Anzeiger*, 119: (5/6) 160-166.

SHARIF, M. — 1930 — A note an monstrosities observed in Indian Ticks. *Rec. Ind. Mus.*, 32. *apud* SCHULZE (1937).

SMITH, C. H. — 1942 — Gynandromorphism in Ixodes dentatus MARX. *Proceedings of Entomological Society of Washington*, 44: 52-53.

STURTEVANT, A. H. — 1929 — The claret type of mutant in D. simulans; a study of chromosome elimination and cell-lineage. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 135: 321-356.

VITZTHUM, H. — 1931 — Acari *in* Kueckenthal's Handbuch der Zoologie, Dritter Band, Zweite Haelfte, Erste Lieferung, Walter de Gruyter u. Co., Berlin-Leipzig, p. 160.

WADDINGTON, C. H. — 1939 — An introduction to modern genetics. The MacMillan Co., New York, p. 441.

—o—

TOXINOGENESE TETANICA EM CULTURAS ASSOCIADAS

POR

C. Rodrigues e V. O. Guida

Do Instituto Biologico de S. Paulo

SUMÁRIO

Influência de diversas bactérias na toxinogenese tetanica
- Introdução
- Resenha bibliográfica
- Material e métodos
- Parte experimental
- Conclusões

Influência do *Clostridium sporogenes* na toxinogenese tetanica
- Histórico
- Modo de ação do *Cl. sporogenes*
- Atividade do filtrado de cultura
- Medida quantitativa da inibição
- Resumo
- Conclusão
- Bibliografia

PARTE I

Tem-se observado repetidas vezes, no Serviço de Anaeróbios do Instituto Biologico, uma coincidencia entre a presença de contaminações acidentais, na sua grande maioria constituidas de sarcinas, e um teor toxico anormalmente elevado dos filtrados das culturas de *Cl. tetani,* evoluidas nessas condições. Este fáto levou-nos a emitir a hipotese de poder ser favorecida a toxinogenese tetanica "in-vitro", pela concomitancia de certas outras bactérias.

Existem na literatura indicações da possibilidade de exaltação de toxinogenese pelo cultivo das bactérias toxinogenicas em presença de especies bacterianas atoxicas. Seria, pois, interessante determinar a possibilidade de associações microbianas desempenharem um papel analogo na toxinogenese tetanica. O presente trabalho foi realizado no sentido de procurar confirmação experimental para esta hipotese.

As experiencias que vamos relatar revelam carencia de base para a suposição inicial, aparentemente apoiada em simples coincidencia. Demonstram, ao contrario, a existencia de agentes microbianos cuja concomitancia é nociva á toxinogenese do *Cl. tetani.* Essa

interferencia nociva, e não util como se poderia supôr, constitue um aspecto particular do trabalho da produção de toxinas de alto teor antigenico e vale a pena examinal-o em detalhe depois de uma rapida revista dos dados sobre o assunto existentes na literatura.

Os trabalhos que se dedicam á toxinogenese tetanica, difterica ou botulinica, em culturas mixtas, não são numerosos, e seus resultados muitas vezes apresentam-se contraditorios. Demais, imprecisões e deficiencias tecnicas frequentemente dificultam a analise e interpretação corretas dos resultados. Nota-se, de um modo geral, tendencia a supôr que as culturas mixtas favorecem a produção de toxina, tendencia que, para o caso do tetano, teria explicação fácil na sua patogênia, já que culturas puras difícilmente determinam a doença.

VAN ERMENGEN, 1897, acreditava que o cultivo do *Cl. botulinum* em mistura com Sarcinas, ou Microcócos, poderia ter como consequencia a obtenção de filtrados mais toxicos que os da cultura pura.

DEBRAND, 1900, trabalhando com culturas mixtas de *Cl. tetani* e *B. subtilis*, em aerobiose, procurou verificar si a associação destes dois germens favorecia a formação de toxina tetanica; só pôde observar, entretanto, que a toxina elaborada nestas condições correspondia á produzida pelo *Cl. tetani* em cultura pura, em anaerobiose. Cobaias inoculadas com porções identicas dos dois filtrados apresentavam a mesma sequencia sintomatologica.

Em relação á *Serratia marcecens*, o mesmo autor verificou que, embora favorecesse a instalação da doença em cobaia, quando inoculada de mistura com esporos de tetano lavados, não tinha ação favoravel na toxinogenese "in-vitro".

ROUX, 1907, associou o *B. subtilis* ao *Cl. tetani*, obtendo em consequencia um aumento na potencia da toxina formada.

ADAMSON, 1919, misturou o *Cl. tetani* a diversas bactérias aerobias como o coli, (*Escherichia* sp.), o proteus, (*Proteus* sp.), o piocianico, (*Ps. aeruginosa*), o estafilococo, (*Staphylococcus* sp.). Notou que a concomitancia de cada um destes germens modificava, em gráu maior ou menor, a multiplicação e a esporulação do *Cl. tetani*. A presença do colibacilo, por exemplo, mostrou-se pouco favoravel á formação de esporos. Em relação á toxinogenese, foi o *Proteus* sp. o unico que formou com *Cl. tetani* uma associação favoravel; resultavam destas culturas mixtas toxinas muito potentes.

NINNI, 1920, preocupado com a pequena ou nula toxidez de culturas mixtas de fezes, contendo o *Cl. tetani*, fez tambem uma serie de verificações, em culturas deste germen, associado a bactérias intestinais, tendo empregado nessas associações exclusivamente bactérias aerobias, isoladas do intestino. Ha, quase sempre, em suas experiencias, evidencia de nocividade das associações, mais acentuada tratando-se de germens em bastonetes que quando são usados cócos; num unico caso, associação com o enterocóco, não houve baixa de toxinogenese mas, ao contrario, aparente aumento. Infelizmente NINNI deixou de anotar a influencia direta desses diversos germens na vegetação do *Cl. tetani*, no pH do meio, etc.

GATÈ e PAPACOSTAS, 1921 e 1926, verificaram que o bacilo difterico cultivado em filtrado de estreptococo aumenta sua produção de toxina; ao contrario os filtrados de pneumobacilo de Friedländer inibem a toxinogenese deste germen.

MATERIAL E MÉTODOS

Para as verificações abaixo expostas, tomamos um grupo de germens do ar, recentemente isolados, e outro de bactérias intestinais, conservadas desde muito tempo nos meios artificiais de laboratorio.

O primeiro grupo foi obtido pela exposição de placas de agar ao meio ambiente do laboratorio. As placas, assim contaminadas com germens existentes no ar, foram em seguida levadas á temperatura de 37°C. Ao fim de 24 horas, foram isoladas colonias dos diversos tipos vegetados, as quais, após purificação e caracterização, foram tomadas para o estudo.

Este grupo experimental tinha por objeto reproduzir, tão exatamente quanto possivel, as contaminações acidentais das partidas rotineiramente utilizadas para obtenção de toxina, e abrangia as seguintes especies:

Ia) — *Bacillus mycoides* FLUGGE, 1886.
Ib) — *Bacillus subtilis* COHN, 1872
Ic) — *Bacillus vulgatus* TREVISAN, 1889.
IIa) — *Sarcina lutea* SCHROETER, 1886.
IIb) — *Sarcina flava* DE BARY, 1887.
IIIa) — *Micrococcus saccatus* MIGULA, 1889.
IIIb) — *Micrococcus sensibilis* ZETTNOW, 1915.
IIIc) — *Micrococcus luteus* COHN, 1872.
IV) — *Flavobacterium proteus* SCHIMWELL e GRIMES, 1936.

O 2.º grupo, constituido de culturas da Coleção do Instituto Biologico, na sua maioria germens intestinais, compreendia as seguintes amostras:

a) — *Serratia marcecens*, n.º 222
b) — *Escherichia coli*, n.º 319
c) — *Proteus vulgaris*, Proteus 0001
d) — *Clostridium sporogenes*, AN

NOTA: Os protocolos descritivos dos germens do 1.º grupo, feitos de acôrdo com o Manual dos Bacteriologistas Americanos, encontram-se em anexo a esta publicação.

MEIO DE CULTURA — O meio utilizado para cultura do *Cl. tetani*, associado aos varios germens acima descritos, é o empregado na rotina da Secção de Bacteriologia do Instituto Biologico, para a produção de toxina tetanica.

Sua formula e feitura são as seguintes:

Coração de vitelo	500 gr
Peptona	10 gr
Cloreto de sodio	5 gr
Agua de bica	1000 cc

Limpa-se o coração, passa-se na maquina de picar carne e junta-se a agua; deixa-se em maceração na geladeira, por uma noite; no dia seguinte, aquece-se lentamente, agitando-se, até que ferva. Filtra-se em papel, e junta-se a peptona e o cloreto de sodio. Dissolve-se bem, ajusta-se o pH a 7,2-7,3, autoclavando em seguida a 115°C, 20', para precipitar os fosfatos.

Reajusta-se o pH a 6,6; filtra-se de novo em papel, e transvasa-se para um balão contendo um pedaço de figado de boi, aproximadamente de 200 gr, embrulhado em papel celofane. Esteriliza-se em seguida a 120°C durante 20', depois do que se cobre o líquido com uma camada de parafina líquida esteril.

Antes da semeadura, este meio deve permanecer 24 horas na estufa, para contrôle de esterilidade.

AMOSTRA DE *CL. TÈTANI* — A amostra do *Cl. tetani* utilizada em todas as experiencias foi a amostra TS, oferecida a um de nós pelo Dr. ARIOSTO BÜLLER SOUTO, e que é empregada na rotina da Secção de Bacteriologia para a produção de toxina tetanica; essa amostra é muito ativa e toxigena; é conservada em agar semi-solido, conforme CONDRÉA.

PARTE EXPERIMENTAL

Como dissemos acima, nosso escopo inicial era verificar si a cultura de certos germens, em associação com o *Cl. tetani*, provocaria a formação de uma toxina tetanica de potencia mais elevada que a de uma cultura de *Cl. tetani* obtida isoladamente.

Para essa verificação, tomamos uma serie de 14 balões, contendo cada um exatamente 300cc do meio de cultura já descrito; em cada balão semeamos 0,5cc de uma cultura de amostra TS, obtida conforme CONDRÉA, isto é, uma cultura conser-

vada em agar semi-solido durante 19 meses. A cada balão juntamos tambem 1cc de uma emulsão de cultura, em gelose inclinada, dos 12 germens de associação acima descritos, incubada a 37°C durante 24 horas. A um ultimo balão juntamos 1cc de uma cultura do *Clostridium sporogenes*, AN, vegetada em Tarozzi.

Um dos balões foi deixado como testemunha, só tendo sido nele semeado o *Cl. tetani*.

Essas diversas culturas foram incubadas a 37°C, e a potencia das toxinas eventualmente formadas foi avaliada, numa primeira serie após o 5.°, 8.° e 12.° dias de permanencia na estufa, e numa segunda e terceira, após o 5.°, 8.°, 11.° e 14.° dias. Para isso retiravamos 30cc de cada cultura, filtravamos em vela Berkfeld N e verificavamos a toxidez desses filtrados, pela inoculação em camondongos. Paralelamente, anotavamos o pH da cultura na ocasião e a evolução de cada germen, pela contagem em preparações coradas.

Para as inoculações, tomavamos sempre grupos de 2 camondongos, cada um dos quais recebia 0,25cc de filtrado, diluido a 1/1000. A evolução dos sintomas era acompanhada durante 6 dias.

Este metodo de analise, embora rudimentar e bastante impreciso, é o unico que permite comparar grande numero de filtrados; esse foi o motivo fundamental de sua escolha.

Pudemos assim estabelecer, de certa maneira, curvas de potencia das toxinas, desde o 5.° dia de cultura até o 12.° ou 14.°; essas curvas foram comparadas á estabelecida pelo filtrado de cultura pura de *Cl. tetani*.

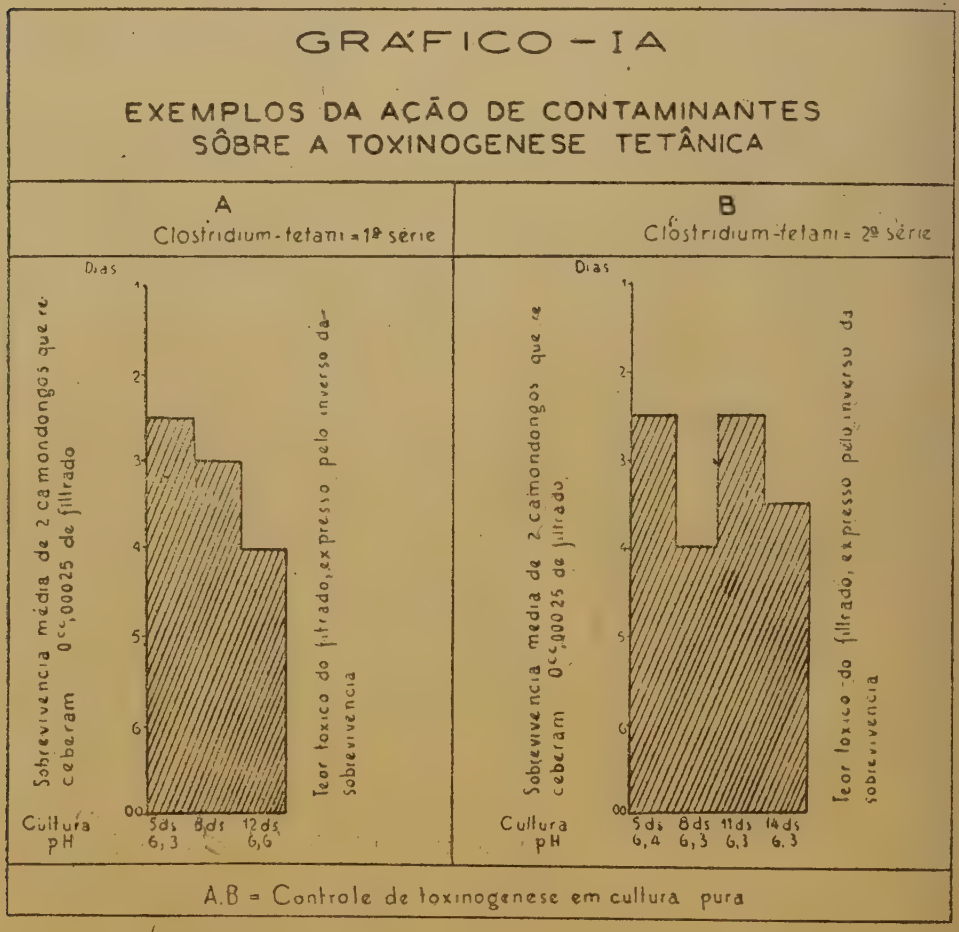
Pelo que nos foi dado observar, a associação do *Cl. tetani* com os germens estudados não favorece a formação de toxina; ao contrario, em algumas ocasiões provoca um retardamento na sua formação; em outras, uma destruição intensa, resultando em rapida baixa da toxidez dos filtrados. Ás mais das vezes, entretanto, não houve influencia perceptivel na toxinogenese e na estabilidade da toxina formada. Finalmente, um unico germen, o *Clostridium sporogenes*, demonstrou capacidade de inibir ou contrariar, em sua quase totalidade, a toxinogenese tetanica.

A analise da evolução, nas culturas mixtas, do *Cl. tetani* e do eventual agente contaminante, embora em alguns raros casos possa trazer um esclarecimento para a curva de toxidez verificada, na maioria deles não induz a nenhuma orientação. Deve-se entretanto considerar o pequeno valor desta analise, baseada em contagem em preparação corada, dependente da uniformidade da distribuição das bactérias e apoiada simplesmente em uma diferenciação morfologica, em muitos casos extremamente dificil.

Quanto á acidez do meio, verifica-se pelas leituras colorimetricas do pH ambiente, feitas na ocasião das dosagens, que pouca

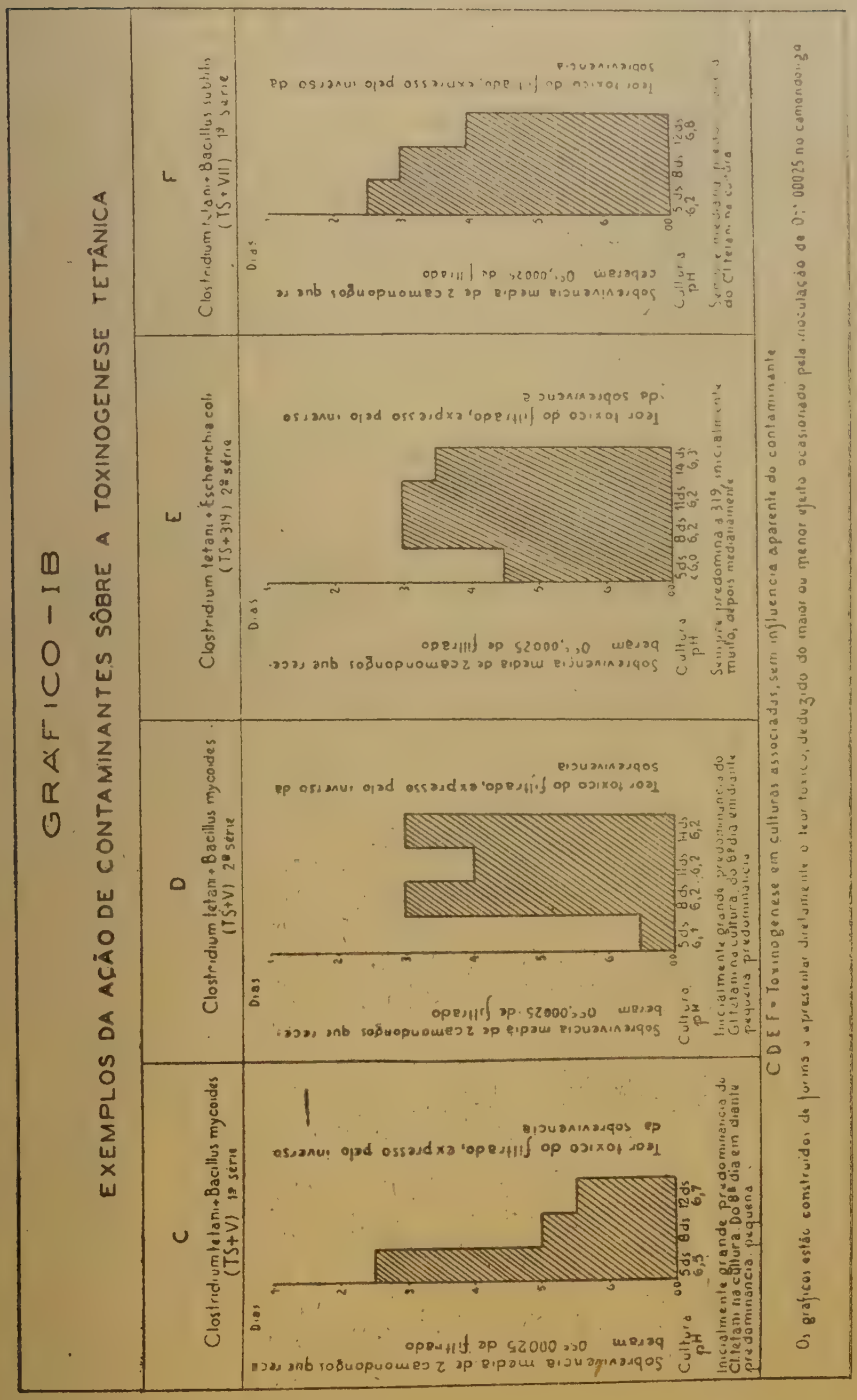
ou nula influencia pode ter tido, quer na toxinogenese propriamente dita, quer na estabilidade da toxina formada.

Em todo caso pareceu-nos que o fenomeno intimo que se evidenciou no retardamento da toxinogenese, em certas associações, e na rapida destruição da toxina já formada, em outras, apoia-se em raizes mais subtis que variações do pH do meio, ou perturbações da vegetação. Faltam-nos elementos para estabelecer qualquer hipotese defensavel. Apenas em relação á amostra AN, *Clostridium sporo-*



genes, foi-nos possivel penetrar um pouco menos superficialmente na natureza dos fenomenos observados, como será ulteriormente demonstrado.

Os resultados das determinações feitas, que se podem apreciar nos diversos graficos apresentados, permitem distribuir os efeitos observados nos seguintes grupos, caracterizados pelo resultado da interferencia do contaminante na toxinogenese:



a) — A presença do contaminante não prejudicou nitidamente a toxinogenese tetanica nem contribuiu para a destruição da toxina já formada. E' o que demonstram o grafico IB, e o grafico II. Pertencem a este grupo os resultados obtidos com os seguintes germens:

Bacillus mycoides,
Bacillus subtilis,
Micrococcus saccatus,
Micrococcus sensibilis,
Flavobacterium proteus,
Escherichia coli,
Sarcina flava,
Sarcina lutea.

Todos os contaminantes aqui incluidos teem pequena influencia na vegetação do *Cl. tetani,* que prepondera fortemente nos primeiros dias de cultura. Apenas depois da primeira semana começa a haver uma tendencia ao equilibrio, que pode ser atingido, ou mesmo ultrapassado, ao fim da segunda semana de vegetação. O pH do substrato, normalmente alterado do valor inicial, 6,6, para o final 6,3 - 6,4, nas culturas puras do *Cl. tetani,* ocilou nas dosagens finais das culturas mixtas entre os limites extremos 6,0 e 6,8, havendo sempre uma tendencia inicial á acidificação e posterior á alcalinização.

b) — A presença do contaminante provoca um retardamento em maior ou menor grau, no estabelecimento do têor toxico maximo das culturas do *Cl. tetani* associado, como se vê no grafico III, letras M e N.

Contribuem para este agrupamento os seguintes germens:
Bacillus vulgatus,
Serratia marcecens.

Contrariamente ao que se poderia supôr, estes germens nem sempre dominam o *Cl. tetani* nas culturas. Apresenta-se, na verdade, ou absoluta e continua predominancia do *Cl. tetani,* como ocorre em sua associação com o *Bacillus vulgatus,* ou a predominancia inicial do associado, como é o caso para a *Serratia marcecens.* Tambem aqui as variações do pH são inconsequentes, oscilando entre 6,3 e 7,0.

c) — A presença do contaminante ocasiona uma destruição precoce da toxina tetanica formada, como se vê no grafico III, letras O e P. Neste grupo estão situadas as seguintes amostras:

Proteus vulgaris,
Micrococcus luteus.

O *Proteus* sempre domina largamente na cultura; o *Micrococcus,* apesar de aumentar proporcionalmente com o correr do tempo, nunca chega a assumir preponderancia. As variações de pH observadas nestas culturas ocilam entre 6,2 e 6,6.

d) — Associações cuja presença coincide com uma notavel diminuição ou mesmo ausencia de toxidez dos filtrados, pelo menos

GRAFICO-II

EXEMPLOS DA AÇÃO DE CONTAMINANTES SÔBRE A TOXINOGENESE TETÂNICA

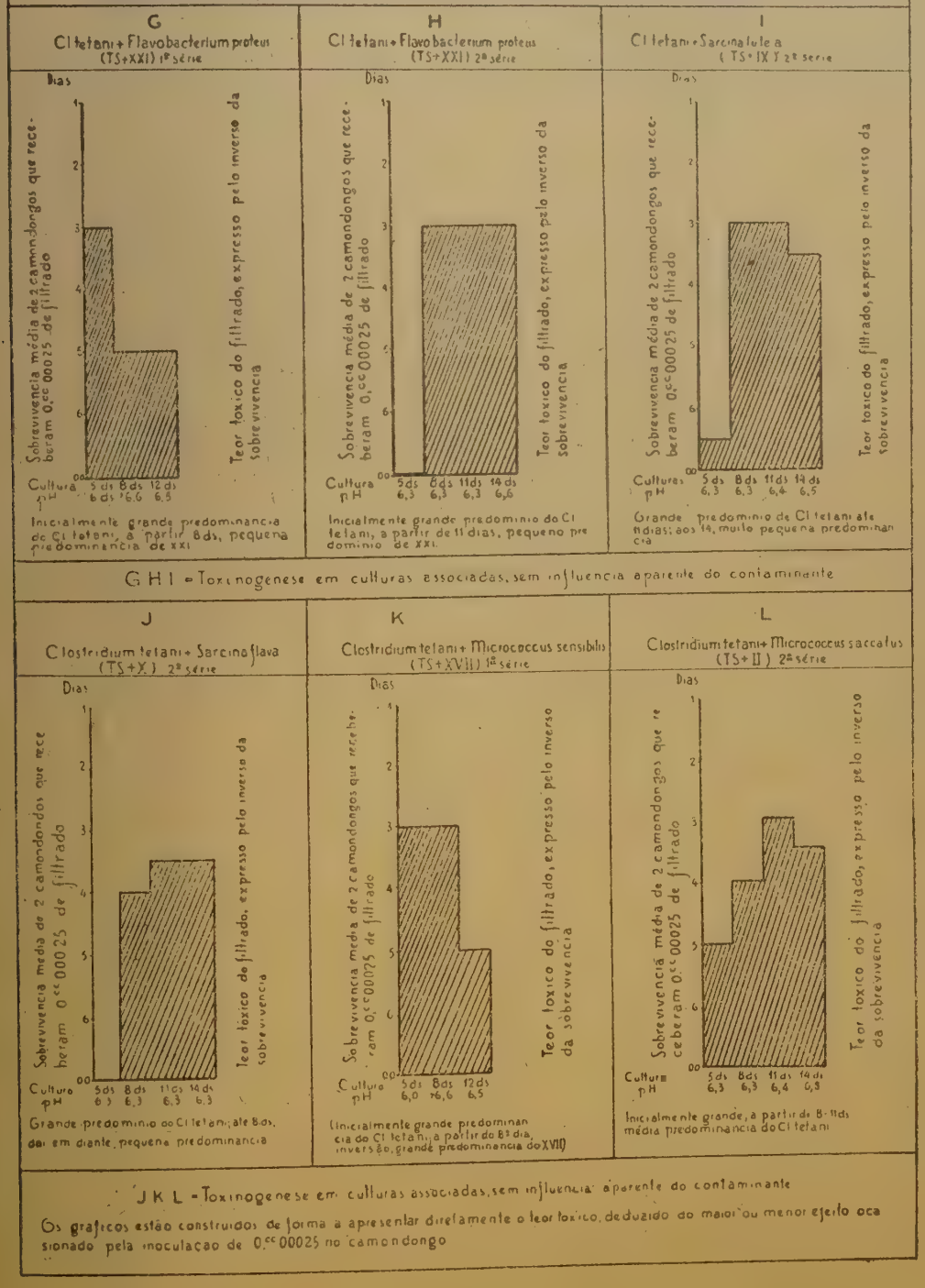
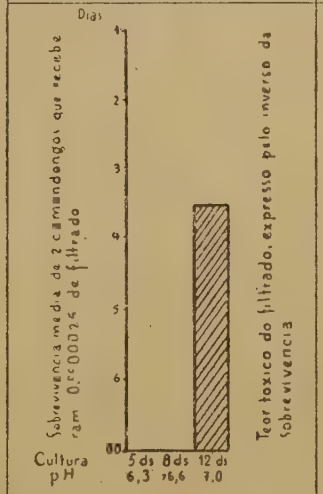


GRÁFICO-III

EXEMPLOS DA AÇÃO DE CONTAMINANTES SÔBRE A TOXINOGENESE TETÂNICA

M

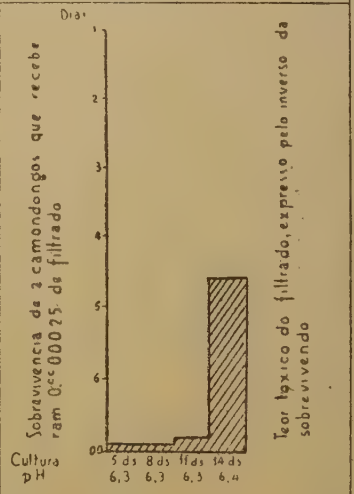
Clost tetani + Serratia marcecens (TS+#222) 1ª serie



Inicialmente pequeno predominio da #222, à partir do 5º dia, crescente predominio do Cl tetani

N

Clost tetani + Bacillus vulgatus (TS+XVI) 2ª serie

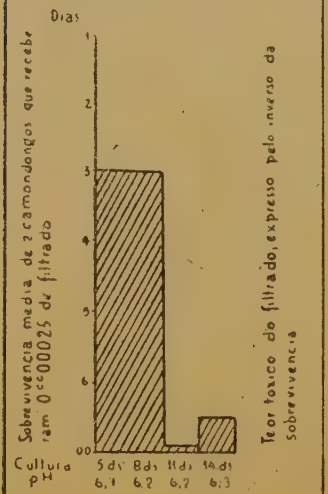


Sempre grande predominio de Cl tetani

M N = Ação retardadora do contaminante

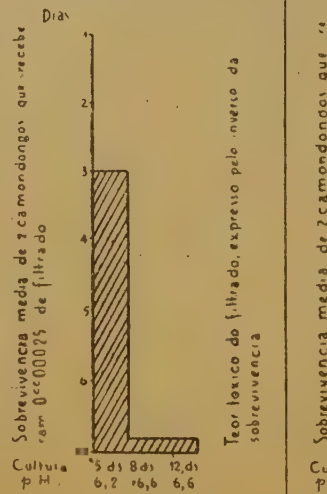
O P Q

Clost tetani + Proteus vulgaris (TS+#0001) 2ª serie



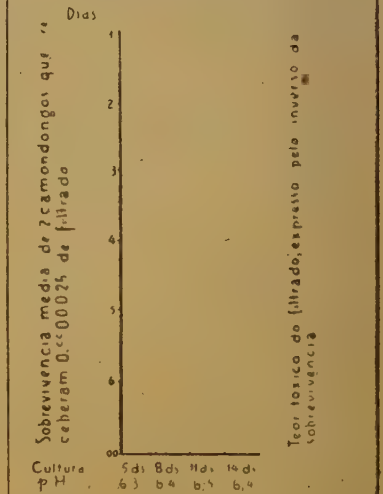
Sempre grande predominio da #0001

Clost tetani + Micrococcus luteus (TS+XIX) 1ª serie



Inicialmente grande, à partir do 8º dia muito pequeno predomio de Cl tetani

Clost tetani + Clost sporogenes (TS+AN col) 2ª serie



Inicialmente predominio medio de AN no 5º dia há inversão, continuando predominio medio de TS

O P = Ação destrutiva do contaminante Q = Ação antagonica do contaminante

Os graficos estão construidos de forma a apresentar diretamente o teor toxico, deduzido do maior ou menor efeito ocasionado pela inoculação de 0,cc00025 no camondongo

até o 14.º dia de cultura, conforme demonstra o grafico III, letra Q. Representando isoladamente este grupo, encontramos o *Clostridium sporogenes,* que apresentou o caracter peculiar e extremamente curioso, de impedir uma formação de toxina tetanica de nivel suficiente para se tornar demonstravel pelo metodo de prova escolhido. Como nos demais casos, ainda aqui se verificou improvavel um relacionamento entre este efeito do *Clostridium sporogenes* e uma impediencia directa do desenvolvimento do *Cl. tetani,* ou a implantação de um pH improprio á toxinogenese.

Sumariando os dados expostos e analisados, foi verificado que a associação a amostra altamente toxígena de *Cl. tetani*, em meio de cultura favoravel á toxinogenese, de determinados germens recentemente isolados do ar ou ha muito conservados em meios artificiais, não tende a exaltar a produção de toxina. Numa parte das provas efetuadas, a associação não foi capaz de produzir nenhuma interferencia perceptivel na toxinogenese. Alem disso, noutra parte a associação mostrou-se capaz de perturbar o processo, no sentido de atrazar o estabelecimento da toxidez maxima da cultura. Uma pequena parte dos associados experimentados determinou um apressamento da destruição da toxina formada. E, finalmente, no caso especial do *Cl. sporogenes*, a associação coincidiu com uma completa atoxidez das culturas de tetano, observadas á luz do metodo de prova utilizado.

PARTE II

De todas as culturas mixtas, analizadas na parte anterior, a que se mostrou mais interessante foi a de *Cl. sporogenes* e *Cl. tetani;* o filtrado desta cultura mixta, injetado em camondongo em determinada concentração, não demonstrava toxidez; no entanto, o filtrado de cultura pura de *Cl. tetani* proveniente da mesma matriz, provocava em camondongos, quando inoculada na mesma concentração, sintomatologia tipica e morte rapida.

Os resultados que acabamos de relatar levaram-nos a uma analise especial do mecanismo desta ação do *Cl. sporogenes* na toxino-

genese do *Cl. tetani*. Esse estudo constitue a segunda parte do presente trabalho, precedido dos dados que a literatura registra sobre o assunto.

Uma das primeiras verificações registadas em literatura e relacionadas a este fenomeno é de Miss CAYLEY, 1917, que examinou exsudados de feridas em pessoas que não apresentavam sintomas clinicos de tetano e encontrou três vezes o *Cl. tetani*, sempre de mistura com outros germens, entre os quais bacterias semelhantes ao *Cl. sporogenes*; prosseguindo em suas observações, Miss CAYLEY pôde verificar que nas culturas totais destes tres exsudados não se observava a presença de toxina tetanica; camondongos com elas inoculados não apresentavam sintomas de tetano. Verificou ainda que uma nova amostra de *Cl. tetani*, bastante toxigena, perdia sua capacidade de formar toxina quando introduzida nestas culturas mixtas.

Uma ação de certo modo antagônica do *Cl. sporogenes* sôbre o *Cl. tetani* foi tambem relatada, em 1918, por DONALDSON; semeando o *Cl. sporogenes* em um filtrado de *Cl. tetani*, este autor verificou queda do poder toxico da toxina, fato aliás não confirmado em nossas experiencias.

Tambem NINNI, 1920, teve a atenção incidentemente voltada para este efeito especial antitoxico do *Cl. sporogenes*, quando presente nas culturas, ao lado do *Cl. tetani*.

Entretanto não se pode dizer que haja aqui uma ação estritamente especifica do *Cl. sporogenes* na toxinogenese do *Cl. tetani*, pois JORDAN e DACK, 1924, estudando a interrelação entre aquele anaerobio e o *Cl. botulinum* verifica que, quando ha predominancia do primeiro, a toxinogenese botulinica é inibida. DACK, 1926, continuando o estudo do fenomeno, analiza a ação do *Cl. sporogenes* no filtrado de cultura do *Cl. botulinum*, e vice-versa; no primeiro caso, o teor toxico do filtrado de botulino baixava gradativamente. No segundo, isto é, semeando-se o *Cl. botulinum* no filtrado de cultura de *Cl. sporogenes*, seu crescimento era quase nulo, a não ser que se aquecesse o filtrado, previamente á semeadura do *Cl. botulinum*; havia então vegetação e formação de toxina.

Ainda devem ser aqui anotadas as interessantes verificações de GATÉ e col., quanto a uma ação inibitória do filtrado do pneumobacilo de Friedländer, na toxinogenese difterica, sem que a toxina já formada sofra qualquer influencia perniciosa. Ver-se-á no decorrer desta exposição que os fatos observados por GATÉ e col. muito se assemelham aos por nós verificados na associação *sporogenes-tetani*.

De acôrdo com as observações publicadas por outros autores e os resultados obtidos nas provas descritas na primeira parte deste trabalho, nas quais associamos em cultura os *Cl. sporogenes* e *tetani*, pareceu-nos conveniente extender o estudo deste fenomeno, com o intuito de evidenciar seu mecanismo.

MODO DE AÇÃO DO *CLOSTRIDIUM SPOROGENES*

Preparamos inicialmente uma serie experimental com o fim de distinguir uma inibição da toxinogenese ou uma destruição de toxina á medida que se formasse.

A primeira experiencia da serie foi ideada no intuito de verificar a ação do *Cl. sporogenes* ou de filtrado de sua cultura na toxina tetanica já formada.

Foram tomadas para essa prova 3 balões, contendo cada um 200cc de um filtrado de cultura de 5 dias a 37°C do *Cl. tetani;* êste filtrado era capaz de provocar, quando inoculado em camondongos de 18-22 gr, na dose de 0,00005 cc, sinais evidentes de contração tetanica.

Adicionamos ao primeiro dos 3 balões 50cc de um filtrado de cultura de *Cl. sporogenes*, obtida pelo crescimento durante 24 horas a 37°C, em caldo-coração mais figado sob vaselina. Ao segundo balão foram juntados 50cc de uma cultura não filtrada do *Cl. sporogenes*, obtida da mesma maneira; ao terceiro foram juntados apenas 50cc de caldo-coração, esteril, para que seu volume se equilibrasse ao dos anteriores. Todos os balões foram então providos de uma camada impermeabilizante de vaselina esteril e colocados na estufa a 37°C.

As provas de pureza, realizadas após 48 horas, demonstraram não ter havido contaminações acidentais.

O teor toxico destas três amostras foi verificado após 48, 72 e 96 horas de incubação, filtrando-se, quando necessário, em vela Berkefeld N e utilizando-se para a prova camondongos de 18-22 grs.

Os resultados destas provas podem ser apreciados na Tabela 1 onde podemos verificar que a toxina tetanica já formada não sofre praticamente a ação do *Cl. sporogenes*, ou de qualquer substancia elaborada por este germen, durante sua vegetação.

ATIVIDADE DO FILTRADO DE CULTURA

Em consequencia dos resultados obtidos nesta serie, outra foi idealizada, já agora para verificar si era necessaria a presença de *Cl. sporogenes*, em franca vegetação, para que fosse impedida a formação da toxina tetanica, ou se a mera presença de um filtrado de cultura desse germen era suficiente para o efeito. Tinha, pois, como objeto determinar si a ação inibidora era devida a qualquer produto soluvel do metabolismo do *Cl. sporogenes*.

TABELA 1

Redosagem de toxina tetanica de potencia inicial igual a 0,00005cc para camondongo, após a permanência a 37° durante periodos variados.

A = Toxina misturada a filtrado de *Cl. sporogenes*
B = Toxina misturada a cultura de *Cl. sporogenes*
C = Toxina misturada a caldo esteril

	— A — 200cc de filtrado Ts 154 + 50cc de filtrado de Cl. sporog. — Dosagem do filtrado em camondongos						— B — 200cc de filtrado Ts 154 + 50cc de cultura de C. sporog. — Dosagem do filtrado em camondongos						— C — 200cc de filtrado Ts 154 + 50cc de caldo-coração esteril — Dosagem do filtrado em camondongos					
Após 48 horas a 37°	Dose em 0.25cc	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
	0.00125	c—c	cc—cc	ccc—ccc	+ +			c—c	cc—cc	ccc—ccc	+ +			c—c	cc—cc	ccc—ccc	+ +		
	0.00025	o—o	o—lc	o—lc	o—lc	lc—c	lc—c	o—lc	o—lc	c—lc	c—cc	cc—cc	c—cc	lc—lc	lc—lc	c—c	ccc—ccc	+ +	
	0.000125	o—o	o—o	o—o	o—lc	lc—lc	lc—lc	o—o	c—c	lc—lc	c—c	c—c	c—c	o—o	lc—lc	c—c	c—c	cc—c	cc—c
	0.00005	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o	c—c	o—o	o—o	lc—lc	lc—lc	o—o	lc—o	lc—o	lc—o	c—c	c—c
Após 72 horas a 37°	Dose em 0.25cc	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
	0.005	c—lc	ccc +	+				c—lc	ccc +	+				cc—c	+ +				
	0.00125	o—o	c—c	cc—cc	ccc—ccc	+ +		o—o	c—c	cc—cc	+ +			o—o	ccc—ccc	+ qm	+		
	0.00025	o—o	o—o	o—o	o—o	o—lc	lc—lc	o—o	c—c	cc—cc	cc—cc	cc—cc	cc—cc	o—o	cc—cc	ccc +	+		
Após 96 horas a 37°	Dose em 0.25cc	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
	0.05	ccc—ccc	+ +					ccc—ccc	+ +					ccc +	+				
	0.01	ccc +	+					cc—cc	+ +					ccc—ccc	+ +				
	0.0025	c—c	+ +					ccc—ccc	ccc—ccc	+ +				ccc—ccc	+ +				

CAMONDONGOS de 18 a 20 gr. 2 camondongos para cada inoculação

o = ausencia de sintomas
lc = leves sintomas
c = contraturas nitidas
cc = contratura franca
ccc = contratura generalizada
qm = agonizante
+ = morto

Tomamos três balões, dos quais dois continham 500cc do meio caldo-coração mais figado, constituindo o terceiro substrato o filtrado de uma cultura de 24 horas de *Cl. sporogenes*, obtida em meio identico. O pH dêste filtrado, originariamente 7,2, foi novamente levado ao nivel de 6,6, identico para todos os balões. Estes 3 substractos foram recobertos com parafina liquida, asseticamente.

Em seguida, cada um dos três balões foi semeado com 2cc de uma mesma cultura de *Cl. tetani* em agar- semi-solido, conforme CONDRÉA; alem disso, um dos balões que continham o meio "normal" foi semeado com 2 cc de uma cultura de 24 horas em Tarozzi, do *Cl. sporogenes*. Todos os 3 balões foram levados á estufa a 37°C. Desta forma, constituimos uma cultura pura do *Cl. tetani* em meio "normal", uma cultura pura de *Cl. tetani* em filtrado de *Cl. sporogenes*, e uma cultura mixta *Cl. tetani* + *Cl. sporogenes*, em meio "normal".

As provas efetuadas no 5.° dia demonstraram pureza das culturas, tendo-se então verificado os seguintes desvios de pH; 6,4 para a cultura do *Cl. tetani* em meio normal; 6,0 para a cultura mixta tetano-esporogenes; 6,5 para a cultura do *Cl. tetani* em filtrado de *Cl. sporogenes*.

Pelo exame periodico de preparações coradas pôde-se tambem verificar que a vegetação do *Cl. tetani* e do *Cl. sporogenes* na cultura mixta decorreu normalmente, com ascendencia do ultimo nas primeiras 24 horas e declinio a partir do 5.° dia; nesta época, a relação entre os dois germens era aparentemente de 2 tetano × 1 esporogenes. Os outros dois balões, semeados apenas com o *Cl. tetani*, demonstraram franca e precoce vegetação.

Após o 5.° dia de cultura, as tres amostras foram filtradas em velas Berkefeld N e feitas provas comparativas do teor toxico, inoculando-se dois camondongos com 0,00025cc de cada um dos filtrados; a evolução dos sintomas foi observada durante 6 dias.

Os resultados expressos na tabela 2 demonstram que, mantidas identicas todas as outras condições, enquanto o filtrado de uma cultura pura de 5 dias do *Cl. tetani* mata o camondongo em 2 dias, quando inoculado subcutaneamente na dose de 0,00025cc o mesmo não acontece com uma cultura mixta de *Cl. tetani-Cl. sporogenes*, que em identicas condições não provoca qualquer sintoma de tetano. Este fato tambem se observa quando fazemos a cultura do *Cl. tetani* em filtrado de cultura do *Cl. sporogenes*.

Pelas observações acima descritas podemos portanto admitir a suposição de que o *Cl. sporogenes* elabora uma substancia filtravel, que difundida na cultura inibe a formação de toxina pelo *Cl. tetani*, sem entretanto pertubar o desenvolvimento normal deste germen.

MEDIDA QUANTITATIVA DA INIBIÇÃO

Levamos a efeito uma terceira série experimental, procurando verificar si a inibição da toxinogenese, provocada pelo *Cl. sporo-*

TABELA 2

Dosagem, em camondongos, de filtrados de cultura de *Cl. tetani* obtidas nas seguintes condições:

A = Cultura de *Cl. tetani* em meio normal, 37°C, 5 dias

Provas culturais			Filtrado esteril da cultura, em velas Berkefeld N						
			Dosagem em camondongos						
			Leitura em 6 dias						
Gram	Pureza	Ph.	Dose em 0.25cc	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
tetano: tipico, abundante	prova aerobia: esteril	inicial = 6.6 final = 6.4	0,00025	cc	cc	++			

A = Filtrado de cultura pura de *Cl. tetani* em meio normal após o 5.º dia de vegetação.

B = Cultura de *Cl. tetani* em filtrado esteril de *Cl. sporogenes*, 37°C, 5 dias

Provas culturais			Filtrado esteril da cultura, em velas Berkefeld N						
			Dosagem em camondongos						
			Leitura em 6 dias						
Gram	Pureza	Ph.	Dose em 0.25cc	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
tetano: tipico, abundante	prova aerobia: esteril	inicial = 6.6 final = 6.5	0,00025	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o

B = Filtrado de cultura pura de *C. tetani* em filtrado esteril de cultura de 24 hs de *Cl. sporogenes* tambem após o 5.º dia de vegetação.

C = Cultura mixta de *Cl. tetani* e *Cl. sporogenes* em meio normal, 37°C, 5 dias

Provas culturais			Filtrado esteril da cultura, em velas Berkefeld N						
			Dosagem em camondongos						
			Leitura em 6 dias						
Gram	Pureza	Ph.	Dose em 0.25cc	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
tetano, tipico espor., tipico	prova aerobia: esteril	inicial = 6.6 final = 6.0	0,00025	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o

C = Filtrado de cultura mixta de *Cl. tetani* e *Cl. sporogenes*, em meio normal, após o 5.º dia de vegetação.

Camondongos de 18-20 grs.
o = ausencia de sintomas
cc = sintomas acentuados
\+ morte

genes, era total ou parcial, isto é, si este impedia completamente a formação de toxina, ou apenas a perturbava em maior ou menor grau.

Para esta nova prova repetimos a experiencia anterior em todos os seus detalhes, acrecidos dos seguintes complementos: 1) verificação das culturas no 5.º e 10.º dias, incluindo dosagem de pH, prova de pureza, estimativa da proporção de germens na cultura mixta, e prova de toxidez dos filtrados; 2) dosagem aproximada do teor toxico, pela inoculação, em camondongos, de proporções variadas de filtrado em vez de uma unica dose.

Os resultados de todas estas provas estão anotadas na Tabela 3.

Verifica-se pela tabela 3 que a inibição da toxinogenese tetanica, seja pela existencia concomitante do *Cl. sporogenes* nas culturas, seja pela simples presença de produtos filtraveis do metabolismo deste, é de caracter quase absoluto.

Mesmo a pequena toxidez observada nestas condições pode ter sido influenciada pelo acarretamento de toxina já formada, quando se efetuou a semeadura com 2cc de cultura velha de *Cl. tetani*; sendo o volume total do substrato apenas 500 cc, seria suficiente a presença de 10.000 dlm camondongo em 1cc da semente, para que os camondongos injetados com a maior dose da cultura morressem de tetano.

Dado que, entretanto, a toxidez das diversas culturas aumenta do 5.º para o 10.º dia de vegetação, fica evidente que não só a toxina trazida possivelmente com a semeadura, mas tambem uma parte formada no proprio substrato, colaboraram para os resultados observados. Desta forma, pode-se supor que a inibição provocada pelo *Cl. sporogenes* na toxinogenese tetanica é apenas parcial, embora muito forte.

Confrontando-se ainda os resultados obtidos quando do emprego de cultura mixta, por um lado, e cultura do substráto já carregado do impediente, por outro, varias hipoteses se levantam, para explicar esta ação antagonica aparentemente parcial: nas culturas mixtas, é possivel ao *Cl. tetani* produzir certa quantidade de toxina, antes que o impediente formado pelo *Cl. sporogenes* atinja uma concentração eficiente; ou mais provavelmente, com base na maior atividade vegetativa do *Cl. sporogenes*, que o *Cl. tetani* seja capaz de, por sua vez, inibir até certo ponto a produção deste impediente, sem contudo destrui-lo.

O agente causal desta inibição da toxinogenese é aparentemente soluvel e portanto filtravel. Ainda não temos outras informações quanto à sua natureza ou quanto às suas propriedades.

TABELA 3

Sequencia do desenvolvimento e toxinogenese de culturas do *Cl. tetani*, em meio normal, a 37°C, observada até o 10.° dia de vegetação e submetida ás seguintes condições:

A = Cultura em associação com o *Cl. sporogenes*
B = Cultura pura em filtrado de cultura do *Cl. sporogenes*
C = Cultura pura em meio normal

APÓS 5 DIAS DE PERMANENCIA A 37°

Cultura mixta de *Cl. tetani* - *Cl. sporogenes* em meio normal

Provas culturais			Filtrado esteril da cultura, em velas Berkefeld N						
			Dosagem do filtrado em camondongos						
			Leitura em 6 dias						
Gram	Pureza	Ph.	Dose em 0,25cc	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
tetano: tipico, = 50% esporo-genes tipico, esporul.	prova aerobia da cultura: negativa	inicial = 6.6 final = 6.5	0.025	lc—o	lc—o	lc—o	c—c	c—c	c—c
			0.0025	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o
			0.00025	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o

Cultura pura de *Cl. tetani* em filtrado de cultura de *Cl. sporogenes*

Provas culturais			Filtrado esteril da cultura, em velas Berkefeld N						
			Dosagem do filtrado em camondongos						
			Leitura em 6 dias						
Gram	Pureza	Ph.	Dose em 0,25cc	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
tetano: tipico, sem esporos	prova aerobia da cultura: negativa	inicial = 6.6 final = 6.5	0.025	lc—c	lc—c	lc—c	c—c	c—c	c—c
			0.0025	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o
			0.00025	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o

Cultura de *Cl. tetani* em meio normal

Provas culturais			Filtrado esteril da cultura, em velas Berkefeld N						
			Dosagem do filtrado em camondongos						
			Leitura em 6 dias						
Gram	Pureza	Ph.	Dose em 0,25cc	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
tetano: tipico, sem esporos	prova aerobia da cultura: negativa	inicial = 6.6 final = 6.5	0.025	cc—c	ccc +	+			
			0.0025	cc—c	ccc +	+			
			0.00025	o—o	lc—c	c—cc	cc—cc	cc—cc	cc—cc

Camondongos de 18 a 20 grs.

o = ausencia de sintomas
lc = leves sintomas
c = contratura nitida
cc = contratura franca
ccc = contratura generalizada
+ = morte

APÓS 10 DIAS DE PERMANENCIA A 37º

Cultura mixta de *Cl. tetani - Cl. sporogenes* em meio normal

Provas culturais			Filtrado esteril da cultura, em velas Berkefeld N						
			Dosagem do filtrado em camondongos						
			Leitura em 6 dias						
Gram	Pureza	Ph.	Dose em 0,25cc	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
tetano: tipico, = 60% esporos soltos de esporogenes	prova aerobia da cultura: negativa	inicial = 6.6 final = 6.5	0.025	lc—lc	lc—lc	c—c	cc—c	ccc—ccc	ccc—ccc
			0.0025	o—o	lc—o	lc—o	lc—lc	lc—lc	lc—lc
			0.00025	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o

Cultura pura de *Cl. tetani* em filtrado de cultura de *Cl. sporogenes*

Provas culturais			Filtrado esteril da cultura, em velas Berkefeld N						
			Dosagem do filtrado em camondongos						
			Leitura em 6 dias						
Gram	Pureza	Ph.	Dose em 0,25cc	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
tetano: tipico, sem esporos	prova aerobia da cultura: negativa	inicial = 6.6 final = 6.5	0.025	o—o	o—o	lc—lc	lc—lc	lc—lc	lc—lc
			0.0025	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o
			0.00025	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o	o—o

Cultura de *Cl. tetani* em meio normal

Provas culturais			Filtrado esteril da cultura, em velas Berkefeld N						
			Dosagem do filtrado em camondongos						
			Leitura em 6 dias						
Gram	Pureza	Ph.	Dose em 0,25cc	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
tetano: tipico, sem esporos	prova aerobia da cultura: negativa	inicial = 6.6 final = 6.5	0.025	c—c	+ cc	+			
			0.0025	c +	+				
			0.00025	c—c	cc +	+			

Camondongos de 18 a 20 grs.

o = ausencia de sintomas
lc = leves sintomas
c = contratura nitida
cc = contratura franca
ccc = contratura generalizada
+ = morte

RESUMO

A observação da presença de contaminantes, na maioria dos casos Sarcinas, em culturas altamente toxicas de *Cl. tetani*, originou a serie de experiencias aqui relatadas, idealizadas para dar confirmação à hipotese de serem certos germens, atoxicos e apatogenicos, capazes de influir favoravelmente na toxinogenese tetanica.

As experiencias efetuadas consistiram em associar, em cultura mixta, o *Cl. tetani* e cada um de representantes dos generos *Bacillus, Micrococcus, Sarcina, Proteus, Escherichia, Serratia, Flavobacterium e Clostridium.*

Ao fim de 5 dias de vegetação, filtrados destas culturas eram inoculados em camondongos, na dose de 0,00025cc, observando-se a sintomatologia até o 6.º dia. Ao mesmo tempo, procurou-se acompanhar a evolução dos dois germens presentes em cada cultura, e as alterações do pH.

Ficou demonstrado, pelas provas efetuadas, que nenhum dos germens associados era capaz de exaltar de forma nitida a toxinogenese tetanica. Ao contrario, alguns influiam no sentido de prejudica-la.

Os efeitos das associações experimentadas puderam ser distribuidos nas seguintes categorias:

a) — ausencia de efeito perceptivel;
b) — retardamento da toxinogenese;
c) — destruição precoce da toxina normalmente formada;
d) — inibição da toxinogenese.

Neste ultimo grupo está situado, isoladamente, o *Cl. sporogenes.*

Em nenhum caso foi possivel relacionarem-se as variações da toxinogenese às alterações do pH, nem à perturbação direta da vegetação do *Cl. tetani.*

Em uma segunda parte do trabalho estudou-se com mais detalhes a ação perturbadora do *Cl. sporogenes.*

Foi possivel determinar que esta ação não se faz sentir na toxina tetanica já formada, sendo na verdade impedida a formação de toxina.

Esta impediencia ainda ocorre na presença de filtrados de cultura de 24 horas do *Cl. sporogenes,* sendo portanto devida a produtos soluveis do metabolismo deste germen.

Pôde tambem ser verificado que a inibição da toxinogenese não é total, embora extremamente ativa.

CONCLUSÃO

1) — Não foi possivel exaltar a toxinogenese tetanica, pela cultura do *Cl. tetani* em associação com representantes dos generos *Micrococcus, Sarcina, Bacillus, Clostridium, Proteus, Escherichia, Serratia e Flavobacterium.*

2) — Ao contrario, a toxinogenese pôde ser perturbada, por certas combinações.

3) — O *Clostridium sporogenes* inibe quase totalmente a toxinogenese tetanica.

4) — Filtrados de culturas de *Cl. sporogenes* têm a mesma ação que culturas totais.

5) — O *Cl. sporogenes* ou filtrado de sua cultura não tem ação na toxina já formada.

Devem ser aqui registados os nossos agradecimentos ao Dr. Vitor Carneiro, que gentilmente se prestou a rever os originais, dando-nos valiosos conselhos quanto à sua redação.

TETANUS TOXIN PRODUCTION IN MIXED CULTURES

Abstract

Contaminants, chiefly Sarcinae, were frequently found in association with Cl. tetani in cultures which proved to contain tetanus toxin in high proportion. The authors were led to consider the hypothesis of a favorable influence of these and other contaminants on the toxin-production of Cl. tetani.

By submitting this hypothesis to a test, the authors observed experimentally the consequences of the growth of Cl. tetani in mixed cultures with representatives of each one of the following genera: Bacillus, Micrococcus, Sarcina, Proteus, Escherichia, Serratia, Flavobacterium and Clostridium.

The toxic content of each mixed culture was determined after the growth at 37.°C. for five days. For this determination, 0.00025cc of the Berkefeld N filtrate of each culture was inoculated subcutaneously in each one of two mice. A relative index of the toxic strength of the tested filtrates was obtained when the actions of those filtrates were compared with that of a pure culture filtrate of Cl. tetani.

Concurrently the pH alterations that occurred in the cultures, as well as the evolution of each of the microorganisms present in the mixed cultures were observed.

According to the experiments it became evident that none of the microorganisms artificially associated to Cl. tetani was able to influence the toxin production in a favorable way. On the contrary some of the associated microorganisms were able to disturb the toxin production, to some extent.

The effects obtained by the associative combinations tested may be so distributed:

a) — *Absence of perceptible effect.*

b) — *Delay in the toxin-formation.*

c) — *Premature destruction of the normally formed toxin.*

d) — *Inhibition of the toxin production.*

Cl. sporogenes alone was able to promote the last mentioned effect.

No apparent relationship could ever be observed between the effects just described and pH alterations or any disturbance in the multiplication of Cl. tetani in the associated cultures.

The second part of this paper was dedicated to a more detailed analysis of the special effect induced by Cl. sporogenes upon Cl. tetani, that is, an almost complete inhibition of the toxin-production.

The authors were able to make clear that Cl. sporogenes was not able to destroy the tetanus toxin already formed, but only to hinder its production. That hindering action was also exhibited by the germ-free filtrate of Cl. sporogenes culture. It was thus demonstrated that the hindering action was due to a soluble and filterable substance and not necessarily to the immediate action of the bacterial cells.

BIBLIOGRAFIA

ADAMSON, R. S. — 1919-1920 — On the cultivation and isolation of B. Tetani. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 23: 241-253.

CAYLEY — 1917 — Citado por Tulloch em: *The Journal of Hygiene*, 1919-1920, 18: 142-147.

CHALIER, J., J. GATÉ e L. GRANDMAISON — 1926 — Les angines á Bacille de Loeffler et á Pneumobacillus associés. *Paris Medical*, 61: 205-210.

CONDRÉA, P. — 1930 — Nouvelle methode pour la preparation d'une toxine tetanique de titre elevé. *C. R. S. B.*, 103: 1044-1046.

DACK, G. M. — 1926 — Influence of some anaerobic species on toxin of Cl. botulinum, with special reference to Cl. sporogenes. *The Journal of Infectious Diseases*, 28: 165-173.

DEBRAND, L. — 1900 — Sur un nouveau procedé de culture du bacille du tetanos. *Annales I. Pasteur*, 14: 757-768.

DONALDSON, R. — 1918 — Character and properties of the "Reading" bacillus, on which a new method of treatment of wounds has been based. *The Journal of Pathology and Bacter.*, 22: 129-151.

GATÉ, J. e G. PAPACOSTAS — 1921 — Á propos de l'antagonisme entre le Bacille diphterique et le pneumobacille. Son explication par le rôle empechante de la toxine pneumobaccillaire vis-à-vis de la sécretion de la toxine diphterique. *Compt. Rend. d. Soc. Biol.*, Paris, 84: 1038-1840.

GATÉ, J. e G. PAPACOSTAS — 1925 — Contribution à l'etude experimentale des associations microbiennes dans la diphterie. *Journ. de Phys. et de de Path. Générale*, 23: 353.

HALL, I. C. e A. PETERSON — 1923 — The effect of certain bacteria upon the toxin prodution of Bacillus botulinus in vitro. *Journ. of Bacteriology*, 8: 319-341.

JORDAN, E. O. e G. M. DACK — 1924 — The effect of Cl. sporogenes on Cl. botulinum. *The Journal of Infectious Diseases*, 35: 576-80.

NINNI, C. — 1920 — La presenza del Bacilo del Tetano nel tubo digerente dei piccoli erbivori e sua Tossicitá-Ricerche sperimentali sul Tetano cultivato in simbiosi. *Annali D'Igiene*, 30: 756-762.

ROUX, E. — 1907 — Sur la culture des microbes anaérobies. *Anales I. Pasteur*, 1: 49-52.

TULLOCH, W. J. — 1919-20 — Report of Bacteriological investigations on Tetanus carried out on Behalf of the War Office Committee for the study of Tetanus. V) — Investigations of mechanism of infection in tetanus. c) — As concomitant infection with certain organism stimulates the growth of spores of B. tetani in tissue, is not possible that the converse may be equally true? May not some concomitant infections reduce the toxigenic capacity of B. Tetani? *The Journal of Hygiene*, 18: 103-202.

VAN ERMENGEN — 1897 — Citado por Hall I. C. e Peterson. *The Journal of Bacteriology*, 1923, 8: 319-341.

APENDICE

Classificação dos germens isolados do ar, de acôrdo com o Manual de Bergey, 5.ª edição, 1939.

Bacillus mycoides

Bastonetes gram positivos, isolados, aos pares ou em cadeias longas, retos, medios, extremidades arredondadas, grossas, esporo oval, central, não entumecendo distintamente. Movel. Colonias grandes, irregulares, com filamentos que se entrecruzam, secas transparentes, centro mais opaco. Gelatina = liquefaz. Caldo simples = crecimento intenso, flóculento, com deposito e pelicula. Leite = peptonisa. Batata = pigmento marron. Indol = negativo. Nitratos = positivo. Glycose, salicina, sacacose, maltose = positivo. Xilose lactose, manita = negativo.

Bacillus subtilis =

Bastonetes gram positivos, isolados, aos pares, curtos a medios extremidades afiladas, finos, esporo central ou subterminal, pequeno, não entumescendo distintamente. Movel. Colonias medias, circulares, acinzadas, translucidas, aderindo ao agar. Gelatina = liquifaz. Indol = negativo. Leite = peptonisa. Batata = pigmento roseo. Caldo = turvação com formação de pelicula na superficie. Sacarose, glicose, maltose, salicina = positivo. Lactose, xilose e manita = negativo.

Bacillus vulgatus =

Bastonetes gram positivos, isolados, aos pares, extremidades arredondadas, Movel. Colonias grandes, mais ou menos circulares, transparentes, medias, superficie esbranquiçada. Gelatina = liquefaz. Caldo simples = turvação e pelicula. Batata crescimento rugoso, pigmento marron. Leite = não altera. Indol = negativo. Nitratos = negativo. Glycose, sacarose = positivo. Manita, salicina, maltose, lactose, xilose = negativo.

Flavobacterium proteus

Bastonetes gram negativos, ocorrendo isolados, aos pares ou em cadeias, devido a ser altamente pleomorfo, apresenta-se tambem em formas cocoides. Imovel. Colonias medias circulares, convexas, amarelas, bordos regulares. Gelatina = não liquefaz. Leite = não altera. Batata = pigmento amarelo. Indol = negativo. Nitratos = positivo. Caldo = turvação. Glycose, lactose, maltose, manita, sacarose, salicina e xylose = negativo.

Micrococcus saccatus

Esferas medias, ocorrendo aos pares ou grupos, gram positivas. Colonias circulares, pequenas, brancas, opacas, convexas, bordos regulares. Gelatina = fusão parcial. Caldo = turvação. Leite = alcalinisa. Batata = pelicula branca. Nitratos = negativo. Indol= positivo. Glycose, sacarose = positivo. Lactose, xilose, maltose, salicina e manita = negativo.

Micrococcus sensibilis

Esferas gram positivas, ocorrendo aos pares ou em grupos. Colonias circulares, medias, opacas, brancas, bordos regulares. Gelatina = fusão crateriforme. Leite = alcalinisa. Batata = coloração branco-marron. Indol = negativo. Nitrato = negativo. Glycose, sacarose, lactose, maltose, manita, salicina e xilose = positivo.

Micrococcus luteus

Esferas gram positivas, ocorrendo aos pares ou pequenos grupos. Colonias pequenas, circulares, medias, laranja. Gelatina = liquefaz. Caldo = turvação. Leite = não coagula. Batata = pigmento amarelado. Indol = negativo. Nitratos = negativo. Maltose, glycose, sacarose = positivo. Salina, manita, lactose = negativo.

Sarcina lutea

Esferas gram positivas, em grupos de varios elementos. Colonias circulares, medias, transparentes, lisas, crême. Gelatina = funde na superficie. Caldo = turvação. Leite = alcalinisa. Batata = pigmento laranja. Indol = negativo. Nitrato = negativo. Glycose, sacarose, lactose = negativo.

Sarcina flava

Esferas gram positivas, ocorrendo em grupos de varios elementos. Colonias circulares, amarelas, pequenas, convexas, bordos regulares. Gelatina = fusão parcial. Caldo = turvação fraca com sedimento amarelo. Leite = não altera. Indol = negativo. Nitratos — negativo. Batata — pigmento amarelo. Sacarose, maltose, lactose, manita, salicina, xilose = negativo.

———o———

ESTUDOS SÔBRE A "MANQUEIRA"
DO PREPARO E CONTROLE DA VACINA FORMOLADA

POR

C. Rodrigues

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 2 figuras no texto

SUMÁRIO

Introdução.
Técnica do preparo da cultura total formolada.
Substrátos de cultura.
Unidade antigenica da espécie *chauvoei*.
Periodo de vegetação e exaltação do antigenismo.
Porcentagem de formol e periodo de permanencia na estufa.
Preparo das matrizes para semeadura.
Técnica finalmente estabilizada para o preparo da cultura formolada.
Demonstração da pequena influencia do substrato empregado.
Modificações introduzidas posteriormente, por motivos circunstanciais, e sua influencia.
Discussão.
Conclusões.
Bibliografia.

INTRODUÇÃO

A manqueira, infecção gangrenosa de bovinos novos, é enzootica no Estado de S. Paulo, havendo regiões onde a maioria dos animais não vacinados é atingida. Sendo uma doença fulminante ou, pelo menos, de evolução extremamente rapida, seu combate só pode ser efetuado com successo por meio de vacinação.

O agente causal da manqueira é o *Clostridium chauvoei*.

O reconhecimento da existencia desta doença no Brasil, assim como as primeiras tentativas de vacinação, devem-se a LACERDA, 1889, que a identificou nos rebanhos do Estado de Minas Gerais, e procurou combatel-a por meio da inoculação de vacina do tipo Lyon. Entretanto a profilaxia sistematica e operante da manqueira só parece ter-se estabelecido após os estudos da Escola de Manguinhos, representados pelos trabalhos de ROCHA LIMA, 1906, GOMES FARIA, 1908 e GODOY, 1910. Desde então a vacina contra a manqueira vem sendo sistematicamente preparada no Brasil, primeiro unicamente pelo Instituto de Manguinhos, sob a forma de cultura atenuada, e, desde 1930, por diversas outras instituições oficiais e particulares, sob diversas formas.

E' atualmente regra geral, no Brasil, proceder-se á vacinação dos bovinos contra a manqueira. Faz-se comumente uma unica inoculação, ao atingirem os garrotes 4-6 meses de idade; revacinações só são efetuadas nos bovinos de zonas fortemente afetadas, em que, pelo fáto de surgirem casos já aos tres meses de idade, a primeira inoculação precisa ser feita muito precocemente. Repete-se por isso a vacinação, reinoculando-se os animais depois de decorridos seis meses, metodo aliás desde muito empregado na America do Norte, como indica SCOTT, 1923. Também animais de valor excepcional costumam ser submetidos a duas inoculações, aos tres e aos nove meses.

Quando o Instituto Biologico nos encarregou de iniciar, em 1930, a produção de um antigeno contra a manqueira para uso no Estado de S. Paulo, inclinamo-nos mais para o emprego de culturas totais formoladas, cuja utilidade havia sido demonstrada por LECLAINCHE e VALLÉE, 1925, e que na ocasião haviam sido objeto de cuidadosas observações, efetuadas por GREEN, 1929. Esse tipo de vacina oferecia vantagens de caráter economico e técnico, que aliás o têm feito assumir preponderancia quasi absoluta no momento atual. Além disso, permitia sua associação a outros antigenos bacterianos, principalmente o antigeno contra o Vibrião Séptico, tido então como responsavel por gangrenas confundiveis com a verdadeira manqueira, as quais se admitia existirem e serem até frequentes no Estado de S. Paulo.

De acôrdo com as ideias predominantes na época, e mesmo durante um largo periodo posterior, documentadas pelas publicações de UCHIMURA, 1921, MANNINGER, 1924, VILJOEN e SCHEUBER 1927, SCHEUBER 1931, GRAUB e ZSCHOKKE, 1936, FREI e RIEDMÜLLER, 1938, decidimos que a Vacina contra a Manqueira produzida pelo Instituto Biologico de S. Paulo fosse uma associação de culturas totais de *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum*, mortas pela ação combinada de formol e calor, inteiramente inocuas em doses massissas, reunidas na proporção de 4 partes de cultura "*chauvoei*" para uma parte da cultura "*septicum*". Esta vacina mixta vem sendo produzida até hoje, e seu uso não tem acarretado qualquer inconveniencia, embora os beneficios trazidos pela introdução do antigeno "*septicum*" possam ser postos em duvida, á luz dos conhecimentos atuais sobre a patogenia da manqueira.

A dose aconselhada para a vacinação de bovinos é de 2cc, incluindo assim 1,6cc de cultura "*chauvoei*" e 0,4cc de cultura "*septicum*".

Desde o inicio de sua produção até a epoca em que se redigiu este trabalho, foram preparadas 140 partidas, de 12.500 doses cada uma; estas 1.750.000 doses foram regularmente distribuidas ao consumo no Estado de S. Paulo, dando bôa prova de seu valor protetor a ausencia de insucessos de vacinação, seja por acidente, seja por brécha de imunidade. O numero relativamente pequeno de partidas produzidas permitiu que se dedicassem a cada uma um cuidado e uma atenção que fogem ás normas industriais de produção em grande escala.

Esta comunicação só se refere ao antigeno *chauvoei*, e enfeixa uma serie de observações efetuadas durante os 14 anos já atravessados pela vacina por nós produzida. Focaliza especialmente questões relacionadas com a técnica de produção. Outras publicações subsequentes darão conta de resultados obtidos no estudo dos seguintes aspectos do problema: 1.º: comparação do poder antigenico do antigeno total morto, formolado, com o antigeno vivo, de cultura atenuada e com filtrado de cultura, formolado; 2.º: estudo comparativo da estabilidade de vacinas mortas e atenuadas; e, finalmente, 3.º: desenvolvimento de um metodo de dosagem de antigeno.

TÉCNICA DO PREPARO DA CULTURA TOTAL FORMOLADA.

SUBSTRÁTOS DE CULTURA

Da experiencia de BERG, 1924, MASON e SCHEUBER, 1936, e especialmente de BOSWORTH, 1930, entre outros, fica claramente indicada a correlação existente entre a capacidade de um dado substráto de permitir ou favorecer um crecimento luxuriante de *Cl. chauvoei* e sua utilidade como base de preparo de vacinas. Póde-se dizer, pois, que tanto mais favoravel é um meio de cultura á produção de antigenos potentes, quanto mais livremente deixa êle desenvolver-se o *Clostridium* da manqueira. Unica excepção a esta regra fazem as observações de SCOTT, 1930, 1932, 1934, que verifica a possibilidade de serem acrescentadas, ao meio de cultura, substancias capazes de provocar um aumento do valor antigenico das vacinas.

Pelos motivos acima enumerados, nunca chegamos, rigorosamente, a cogitar de experiencias comparativas entre os meios de cultura empregados pelos diversos autores. Tambem nos falta inteiramente a possibilidade de comparação entre os resultados por estes observados e os nossos, dada a pouca confiança que merecem os metodos de prova de antigenicidade até hoje empregados. Limitar-nos-emos, portanto, a apresentar resultados obtidos por nossa experiencia,

quer lidando com pequenas séries, quer no decurso do trabalho de rotina industrial.

Não tendo havido a preocupação de procurar um novo meio de cultura, ou mesmo de selecionar o casualmente melhor, entre os diversos usados por outros autores, nossas verificações se apoiaram todas no uso, como base, do substrato aconselhado por SCOTT 1930, 1932, e que, por meio de adições e tratamentos diversos, procuramos melhorar no sentido de obter vegetação muito rapida e o mais intensa possivel. Apenas abrem excepção a esta regra duas pequenas series de partidas experimentais, que em seu lugar serão analizadas.

Maior merito têm estas verificações por se efetuarem em grandes partidas, 25 litros para cada prova, e por se terem repetido muitas vezes. Si não podemos, por efeito delas, apresentar o melhor meio de cultura para a obtenção de vacinas *chauvoei*, sentimo-nos autorizados e indicar um substráto de simples preparo, no qual se obtêm regularmente vegetação precoce e vigorosa da amostra que empregamos e donde resultam vacinas de grande eficiencia.

A evolução do preparo de antigenos contra a manqueira, no Serviço de Anaerobios do Instituto Biologico, póde ser desdobrada em trez fases bem distintas: a primeira abrange as partidas de n.º 1 a 58, produzidas entre dezembro de 1930 e março de 1939, que não puderam ter seu valor antigenico estimado no laboratorio; destas partidas só temos as informações obtidas de seu emprego na pratica e os dados subjetivos, fornecidos pela observação do curso da vegetação e de preparações coradas.

A segunda fase se caracteriza por tentativas mais ou menos desordenadas e tateantes, para a avaliação do antigeno em laboratorio. A ela podem ser relacionadas as brilhantes verificações de DACORSO, 1940, efetuadas sob nossa orientação e em nosso laboratorio, que deixaram claramente demonstrado não ser aplicavel a vacinas bacterianas o metodo de dosagem expresso em unidades agressinicas, proposto por GOSS e SCOTT, 1919, para aferição de agressinas e filtrados. Esta segunda fase abrange as partidas de n.º 59 a 68, produzidas entre agosto de 1939 e junho de 1940.

A terceira faze, afinal, iniciada com a partida de n.º 69, ainda perdura ao ser produzida a de n.º 148; enquadra-se portanto no periodo de junho de 1940 a abril de 1945 e é caracterizada pelo emprego sistematico de um metodo de dosagem baseado na resistencia de cobaias vacinadas.

Para que se tenha uma ideia geral das diversas etapas que constituem cada uma destas fazes, no que se relaciona aos substrátos culturais empregados,

apresentamos aqui uma lista das partidas industriais até agora preparadas, juntamente com os dados relativos ao periodo a que pertencem e ás sucessivas alterações de substráto. As series experimentais deixam de ser incluidas.

1.ª faze

Partidas mq1 a mq13 (janeiro 1931-maio 1932). Caldo conforme Scott, c/ peptona Witte. Figado não embrulhado.

Partidas mq14 a mq18 (julho 1932-dezembro 1932). Caldo conforme Scott, (Caldo Höttinger). Figado não embrulhado.

Partidas mq19 a mq43 (fevereiro 1933-novembro 1936). Caldo conforme Scott, glycosado, c/ peptona Witte. Figado embrulhado.

Partidas mq44 a mq58 (julho 1937-março 1939). Caldo conforme Scott, glycosado c/ peptona de sangue. Figado embrulhado.

2.ª e 3.ª fazes

Partidas mq59 a mq71 (agosto 1939-julho 1940). Caldo conforme Scott, glycosado, c/ peptona Witte, figado embrulhado.

Partidas mq75 a mq116 (setembro 1940-dezembro 1942). Caldo conforme Scott, glycosado, c/ peptona Witte e caldo figado a 1:4.

Partidas mq117 a mq134 (abril-1943-agosto 1944). Caldo conforme Scott, glycosado, c/ peptona Gayer e caldo figado a 1:4.

Partidas mq135 a mq148 (setembro 1944-abril 1945). Caldo conforme Scott, glycosado, c/ peptona Gayer, caldo figado a 1:4 e figado embrulhado.

Deixamos de parte, na sua grande maioria, os resultados fornecidos pelas observações denominadas da primeira faze, que, pelo seu absoluto gráo de subjetividade, não têm documentos em que se apoiar. Das verificações então feitas, pudemos apenas deduzir o muito nitido valor da glycose, em pequena proporção, no favorecimento e na intensificação das culturas obtidas; por esta razão, em todas as fazes sucessivas, utilizamos sistematicamente substrátos glycosados. Também causaram excelente impressão os meios de cultura preparados, durante um curto periodo, com peptona de sangue fabricada pela casa Merck. Infelizmente, poucas partidas puderam ser preparadas com esta peptona, pois o estoque disponivel logo se esgotou e não se apresentou a possibilidade de reformal-o. Experiencias ulteriores, efetuadas para determinar o valor da junção ao substráto comum, de sangue desfibrinado de carneiro, aquecido ou não, não deram os resultados esperados. Aliás, á mesma consequencia levaram experiencias de SCHEUBER e MASON, 1936.

O substráto basico, tomado desde o inicio, quer para as partidas de produção industrial, num volume de vinte e cinco litros, quer para as experimentais, foi sempre o mesmo, calcado em suas linhas gerais no aconselhado por SCOTT, 1930. Apenas se substituiu o cerebro por carne ou figado, conforme alteração proposta por VAWTER, 1930, e se acrescentou caldo simples de carne, em substituição á água distilada. Também, de acôrdo com o acima explicado, juntou-se sis-

tematicamente 1% de glycose a todos os substrátos preparados depois de 1932.

Desta forma, o meio basico pode ter sua preparação assim descrita:

Carne de boi, bem moída e desingordurada . . . . 500 gr
Agua de torneira . . . . . 500 gr

Deixar em geladeira 24 hrs.; expremer muito bem, em flanela; deixar de parte o extrato obtido.

Juntar ao bagaço:

Agua de torneira . . . . . 500 gr
Peptona . . . . . 20 gr

Ferver durante 10', coar em flanela; juntar ao primeiro extrato obtido e, em seguida, os seguintes sais:

Bifosfato de amonio ($NH^4\ H^2\ PO^4$) . . . . . 0,6 gr
Bicarbonato de potassio ($KH\ CO^3$) . . . . . 0,5 gr
Citrato ferrico ($FeC^6\ H^5\ O^7\ .\ 3H^2\ O$) . . . . . 0,3 gr
Citrato de potassio ($K^3C^6H^5O^7\ .\ H^2O$) . . . . . 1,6 gr

Dissolver; regular a acidez na viragem do fenolftaleina; ferver rapidamente; dosar o pH a 7, 8; filtrar e distribuir em balões de fundo chato, enchendo-os o mais possivel. Para as partidas industriais usamos balões de 6.000cc de capacidade, contendo 5.000cc do meio de cultura.

Colocar no fundo de cada balão um pedaço de figado de boi, proporcionado á massa do meio na relação aproximada de 1:20; sobrepôr uma camada de vaselina, de mais ou menos 2 cm de espessura.

Este meio deve ser esterilizado pela exposição a 100°C durante 30', no autoclave, em três dias sucessivos. Imediatamente antes do terceiro aquecimento, junta-se aséticamente uma solução esteril de glycose, de modo a obter uma concentração final de 1%.

Este meio de cultura deve ser semeado ainda quente, á temperatura de 45°C, aproximadamente, logo em seguida ao ultimo aquecimento.

O substráto acima descrito foi utilizado inalterado entre agosto de 1939 e julho de 1940, exatamente um ano. A unica modificação então introduzida foi o acondicionamento dos pedaços de figado em papel celofane, já aconselhado por MAC EWEN, 1926, com o fim de impedir a presença ulterior, na cultura-vacina, de fragmentos deste orgam. A peptona utilizada nesta ocasião era da marca Witte. Protocolos tipicos desta serie são reproduzidos nas figuras 1 e 2, as quais são introduzidas no intuito principal de fornecerem uma impressão de conjunto, quanto aos diversos passos da tecnica de preparação de vacina contra a manqueira, aqui adotada.

A tabela 1 fornece dados para uma analise conjunta das 14 partidas industriais preparadas nas condições descritas. Vê-se por ela que nesse estadio de seu progresso, nossa vacina contra a manqueira não apresentava no laboratorio provas evidentes de seu valor, embora o emprego cauteloso no campo indicasse qualidade antigenica suficiente para a proteção de bezerros.

Vaccina contra a manqueira

Preparo da partida n.º 64 ..... 27,5 litros

Amostras Anaer. VS 3 (Cob. 4747), 43 (Cob. 4241), Mg 16 (Cob. 7262), Mg 1 (Cob. 7103).

Tarozzi 14.XII.39. (Vabte 24 hrs) Balão de cultura Scott glycosado, sob vaselina 15.XII.39

Vegetação Pobre 24 hrs. Franca 48 hrs. Retirada da estufa 23.XII.39

Gram		Cultura aerobia
Balão A (Chauvoel)	Mg 1: Puro, s/esporos	Esteril 3 ds.
„ B („)	Mg 16: " "	" "
„ C („)	43 " "	" "
„ D („)	43 " "	" "
„ E (V. Septico)	3 " "	Vegetação entre o agar e o tubo. 3 ds.

Filtração em gaze, em 23.XII.39

Formolagem 23.XII.39 Porcentagem { Chauvoel 0.2% / V. Septico 0.5% }

Retirada da estufa 2.1.40

Prova de innocuidade por inoculações em cobayas - 2.1.40

N.º das cobayas	Material	C. C.	Via	Resultado
7607 (350 grs) 7608 (300 grs)	Ch.	3	s.c.	OK em 9.1.40
7609 (300 grs) 7610 (310 grs)	VS.	2	s.c.	OK em 9.1.40

Prova de esterilidade

Cultura aerobia 2/1. 02 ds. 07 ds. Cultura anaerobia 2/1. 02 ds. 07 ds.

Resultado da dosagem { Chauvoel / V. Septico }

Mistura 7.1.40 Volume total 28 litros 14.000 doses

Entregue á distribuição em 12.3.40 Technico

Fig. 1 — Protocolo de preparo de vacina contra a manqueira. Facsimile.

O programa de melhoria então traçado abrangeu estudos referentes a diversos detalhes de execução e teve especificadamente em

Dosagem da vaccina "Chauvoei"

Prova de immunisação

Cobaya	C. C.	Data	Virus	Data	Observações
7651 (350 grs)	1	9/1/40	0,3 cc	12/2/40	OK 22240
7646 (250 grs)	1	"	0,3 cc	"	✝ 14240 Manqueira
7655 (320 grs)	1	"	0,3 cc	"	OK 22240
7650 (320 grs)	1	"	0,6 cc	"	✝ 14240 Manqueira
7657 (220 grs)	1	"	—	—	✝ 11240 s.s.
7653 (300 grs)	1	"	—	—	✝ 12240 s.s.
7648 (250 grs)	1	"	—	—	✝ 16140 s.s.
7656 (280 grs)	1	"	1 cc,2	12/2/40	✝ 14240 Manqueira
7654 (320 grs)	1	"	0,6 cc	"	✝ 14240 Manqueira
7649 (250 grs)	1	"	—	—	✝ 6240 s.s.
7647 (270 grs)	1	"	0,6 cc	12/2/40	✝ 14240 Manqueira
7652 (250 grs)	1	"	1,2 cc	"	✝ 14240 Manqueira
8014 (430 grs)	—	—	0,3 cc	"	✝ 14240 Manqueira
8012 (650 grs)	—	—	0,3 cc	"	✝ 13240 Manqueira
Proteção	contra 1 DM 100 = 2/3				
	" 2 " " = 0/3				
	" 4 " " = 0/2				
Dosou					

Virus empregado 77 reativada 1 DM 100 = 0cc,3

Fig. 2 — Protocolo de dosagem de vacina contra a manqueira. Facsimile.

vista: procurar obter amostras mais antigenicas, ou procurar exaltar a das de que dispunhamos; analizar o efeito da junção de quantidades variaveis de formol e da maior ou menor rapidez da desvitalização, dependendo naturalmente da soma dos efeitos da taxa de formol e da permanencia a 37°C; aperfeiçoamento do método de prova de antigenicidade; melhoria do substrato utilizado para a cultura, no sentido de promover vegetação mais rapida e intensa.

TABELA 1

Caracteristicas das partidas de vacina contra a manqueira, preparadas entre 5/9/39 e 17/8/40

Partida	Data	Vegetação		Transformação em vacina		Inocuidade	Dose vacinante	Proteção após 4 semanas, contra:					Observações
		Aspecto	Prazo	Curso	Formol			1DM	2DM	3DM	4DM	5DM	
59	5-9-39	Franca, Precoce	10 ds	Muito Acidentada	2 + 1 + 2°/₀₀	Completa	1 cc	* 2/3	2/6	—	—	—	Testemunhas c/ 1DM = 0,5cc = + 24 hrs.
60	30-9-39	Franca, Retardada	8 ds	Acidentada	2 + 1°/₀₀	»	1 cc	3/6	2/6	—	—	—	c/ 2DM = 1cc = + 24 hrs.
61	14-11-39	Franca, Retardada	8 ds	Normal	2°/₀₀	»	0,5cc	4/4	2/4	—	0/3	—	Testemunhas c/ 1DM = 0,3cc = + 5/5
62	28-11-39	Franca, Precoce	8 ds	»	2°/₀₀	»	0,5cc	2/3	0/3	—	0/3	—	c/ 0,2cc = + 3/5
63	28-11-39	Franca, Retardada	8 ds	»	2°/₀₀	»	1 cc	3/3	0/3	—	0/3	—	Testemunhas c/ 1DM = 0,3cc = + 2/2
64	23-12-39	Franca, Retardada	8 ds	»	2°/₀₀	»	1 cc	2/3	0/3	—	0/3	—	
65	Desprezada por não se tornar esteril mesmo após junção de 5% formol, e longa permanencia a 37°C												
66	23-3-40	Franca, Precoce	7 ds	Muito Acidentada	2 + 1 + 1°/₀₀	Completa	1 cc	0/6	0/5	—	—	—	
67	15-4-40	Franca, Precoce	7 ds	Acidentada	2 + 1°/₀₀	»	1 cc	3/4	3/4	—	—	—	Testemunhas c/ 1DM = 0,3cc = + 3/3
68	22-6-40	Regular, Retardada	8 ds	»	2 + 1°/₀₀	»	1 cc	0/4	0/4	0/4	—	—	
69	29-6-40	Regular, Retardada	8 ds	»	2 + 1°/₀₀	»	1 cc	1/11	—	—	—	—	Testemunhas c/ 1DM = 0,3cc = + 2/2
70	9-7-40	Franca, Precoce	8 ds	»	3 + 1°/₀₀	»	1 cc	0/11	—	—	—	—	
71	13-7-40	Franca, Precoce	8 ds	»	3 + 1°/₀₀	»	1 cc	1/10	—	—	—	—	Testemunhas c/ 1DM = 0,3cc = + 3/3
74	17-8-40	Mediocre	10 ds	Normal	3°/₀₀	»	1 cc	6/13	—	—	—	—	

NOTA: — Na coluna "Transformação em vacina" o termo "Acidentada" é empregado no sentido de registar perturbações no processo, ou pela necessidade de maior quantidade de formol para desvitalização, ou pela maior permanencia da cultura formolada na estufa, ou por ambas.

* Numero de cobaias protegidas/ numero de cobaias provadas.

PRIMEIRA COMPARAÇÃO DE SUBSTRATOS DE CULTURA

Inicialmente, foi promovida uma serie experimental, em volumes de 1,6 lt, na qual se comparou o meio de cultura no momento considerado normal, com as duas seguintes modificações:

a) — Substituição do figado embrulhado em celofane por caldo de figado, juntado ao substrato na proporção de 1:4.

b) — Substituição completa do meio "normal" por caldo de carne, peptonado, glycosado a 1%, acrecido de caldo de figado a 1:4.

O caldo de figado empregado nestas series é preparado exatamente da mesma maneira que o caldo de carne.

Na tabela 2 se apresentam os resultados fornecidos por esta serie experimental, que deixaram evidente a conveniencia de manter, como meio basico, o até então tomado como "normal", e a vantagem em substituir o pedaço de figado envolto em celofone pelo caldo de figado, em proporção de 1:4.

UNIDADE ANTIGENICA DA ESPÉCIE

Foi abordada em seguida a questão de saber si havia necessidade de serem empregadas na preparação da vacina numerosas amostras de *Clostridium chauvoei,* ou si bastava o uso de uma unica amostra, desde que dotada de energica capacidade antigenica.

Embora alguns autores, VISWANATHAN, 1936, e MARTIN, 1937, entre outros, insistam na conveniencia e vantagem da utilização de numerosas amostras no preparo da vacina, já VILJOEN e SCHEUBER, 1927, chamavam a atenção para a unidade antigenica da especie *chauvoei,* tornando desnecessario o emprego de mais de uma amostra para a obtenção de antigenos eficientes. Estudos ulteriores de HENDERSON, 1932, e UENAKA, 1938, especialmente os do primeiro, vieram reforçar a ideia da homogeneidade antigenica da especie, pelo menos no que se relaciona com a imunidade ativa.

Para o preparo das vacinas até então utilizadas, lançavamos mão das seguintes amostras: 1) — Anaerobio 5, recebido de SORDELLI, Republica Argentina; 2) — Anaerobio 10, Segovia, oferecido por CARINI, Instituto Paulista de Biologia; 3) — Anaerobio 43, Manguinhos, isolado da vacina contra a manqueira do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; 4) — mq 1; 5) mq 3; 6) mq 16; 7) mq. 30; as quatro ultimas isoladas de casos autochtones de manqueira.

Para a prova de infeção dos animais vacinados utilizou-se sempre o anaerobio 77, *Clostridium chauvoei* G 1, isolado de bovino na Inglaterra e a nós gentilmente enviado por HENDERSON, em 1936. É uma amostra de virulencia especialmente estavel.

A serie constituida pelas partidas industriais 75-76-77 foi planejada para elucidar esta questão, da necessidade de se prepararem

TABELA 2

Em que são submetidos a comparação diversos substratos.

Tipo	Partida	Data	Vegetação		Transformação em vacina			Inocuidade	Proteção após 4 semanas, contra:				Observações
			Aspecto	Tempo	Curso	Formol	Tempo		Dose vacinante	1DM	2DM	3DM	
Standard	69	22-6-40	Regular Retardada	8 ds	Acidentada	2 + 1 °/₀₀	14 ds	Completa	1 cc	* 0/4	0/4	0/4	Testemunhas c/ 1DM = 0,3 cc + 3/3 Virus de prova 77.
A	72	26-7-40	Bôa	7 ds	Normal	2 °/₀₀	7 ds	»	1 cc	2/2	0/2	0/3	
B	73	26-7-40	Bôa	7 ds	Normal	2 °/₀₀	7 ds	»	1 cc	0/2	0/2	0/3	

OBSERVAÇÃO — As vacinações foram feitas simultaneamente. Da mesma forma a ulterior prova de infeção.
* Numero de cobaias protegidas/ numero de cobaias provadas.

TABELA 3

Comparação entre vacinas preparadas com uma e varias amostras

Tipo	Partida	Data	Vegetação		Transformação em vacina			Inocuidade	Prova de proteção, após 4 semanas		Observações
			Aspecto	Tempo	Curso	Formol °/₀₀	Tempo		Dose vacinante	Resistem a 1DM	
Numerosas Amostras	75	13-9-40	Regular	7 ds	Acidentada	3 + 1 °/₀₀	12 ds	Completa	1 cc	11/12	Dose de prova fraca. 0,4cc mata 4/5 das testemunhas Virus = 77 1DM = 0,4cc
1 Amostra	76	14-11-40	Fraca	7 ds	Acidentada	3 + 2 °/₀₀	12 ds	»	1 cc	15/15	
1 Amostra	77	26-12-40	Regular	8 ds	Normal	5 °/₀₀	8 ds	»	1 cc	9/9	

OBSERVAÇÃO — As vacinações foram efetuadas simultaneamente. Da mesma forma a ulterior prova de infeção.

vacinas com varias amostras. A partida 75 foi preparada com numerosas amostras, as de numeros 76 e 77 apenas com a amostra Manguinhos.

O meio aqui utilizado foi o normal, acrecido de caldo de figado a 1:4.

Na tabela 3 estão expostos os resultados experimentais atingidos; de sua analise se pode deduzir que não ha diferença perceptivel no valor antigenico de vacinas preparadas com uma ou multiplas amostras de *Clostridium chauvoei*, postas á prova contra amostra não empregada no preparo dos antigenos.

PERIODO DE VEGETAÇÃO E EXALTAÇÃO DO ANTIGENISMO

A ideia de que a imunidade induzida contra a manqueira decorre da presença da substancia antigenica, em solução no liquido vacinante, apoiada sobretudo pelas verificações de imunidade provocada por filtrados e agressinas, levou alguns autores a prolongar o periodo de vegetação do *Cl. chauvoei* o maior tempo possível, havendo sido mesmo elaboradas técnicas destinadas a extender artificialmente a duração desse periodo. Assim BERG, 1924, com seu substrato fortemente glycosado e contendo calcio, que permitia vegetação por 30 dias; NITTA, 1918, propondo a vegetação por 10 dias; SCOTT, 1923, 9 dias. VILJOEN e SCHEUBER, 1927, readicionavam glycose, com reajustamento do pH; SCHMIEDHOFER, 1932, tomava culturas de 1 a 3 semanas.

Com exceção do ultimo, todos os autores acima citados procuravam obter filtrado de cultura.

Mais modernamente, e de acordo com a tendencia geral para ligar a imunidade contra a manqueira á ação do antigeno somatico, termoestavel, e portanto ao corpo bacteriano, o tempo de vegetação perdeu interesse. Si, no caso de se usar como antigeno o filtrado de cultura, é previsivel o aumento do teor de antigeno em solução, pela maior permanencia na estufa, e portanto mais acentuada lise bacteriana, o mesmo não se dá quando se empregam, como em nosso caso, culturas totais para a vacinação. Nesta circunstancia, e desde que sejam providas condições suficientes para uma vegetação precoce e intensa do *Clostridium chauvoei*, é de supôr que mesmo permanencias relativamente curtas a 37°C sejam suficientes para originar culturas-vacinas altamente eficazes.

Já MC EWEN, em 1926, verifica identidade de ação de filtrados de cultura de 2 e de 14 dias. Esta verificação tem especial interesse por dizer respeito a filtrado de cultura; mas é contraditada por

BOSWORTH, 1930. MASON a SCHEUBER, 1936, decidiram-se, após numerosas comparações, por uma cultura de 36 horas, chegando a admitir a possibilidade de longa incubação e produtos metabolicos destruirem o antigeno já existente. Também MARTIN, 1937, prefere culturas recentes, de 1 a 4 dias.

Uma questão naturalmente ligada á anterior seria a de saber si existe maior ou menor gráu de capacidade antigenica em diferentes amostras do *Clostridium chauvoei*, ou ainda si uma mesma amostra poderia, conforme as condições, modificar o grau de seu antigenismo. A este respeito chamou-nos, desde cedo, a atenção, a possibilidade de relacionamente de um elevado valor protetor com o fáto de hemoculturas primarias de cobaias infectadas promoverem, quando transferidas diretamente aos balões de cultura para vacina, um crecimento mais intenso e regular que repiques de culturas de estóque. Coincidindo com esta observação, notava-se nas hemoculturas de cobaias uma esporulação precoce e muito intensa, ao contrario do comumente observado em repiques de culturas de estóque.

A utilização, para a vacina, de culturas recentemente passadas no animal é preconizada por numerosos autores. MASON e SCHEUBER, 1936, usam para suas semeaduras um repique de 18 horas em meio de Hibler, da hemocultura direta de cobaias. MARTIN, 1937, prefere semear diretamente com o figado de cobaia infectada, sacrificada em agonia. BASSET e PAILLE, 1930, insistem na necessidade de reativação e semeadura direta, do sangue do coração da cobaia. Também CORDIER, 1926, fala de cultura diretamente do animal.

Guiados pelas indicações dos autores citados, e também pelas nossas observações, mesmo antes de ter levado a efeito qualquer prova comparativa, vinhamos utilizando regularmente, no preparo de nossas culturas-vacinas, o que chamamos amostra reativada, significando matriz obtida por hemocultura primaria de cobaia infectada. Na verdade, com isso se obtem tambem uma grande exaltação da virulencia, já observada por VILJOEN e SCHEUBER, 1927.

A serie experimental condensada na Tabela 4 foi disposta no duplo intuito de deixar objetivamente confirmada a vantagem do método de sementes reativadas, ao mesmo tempo que determinar o interesse relativo de prazos longos ou curtos, de vegetação.

Esta serie deixa bem evidente a utilidade de serem empregadas como matrizes, na preparação de culturas do *Clostridium chauvoei* destinadas á transformação em vacinas, amostras recentemente reativadas pela passagem em cobaia.

Dá também uma indicação, embora menos evidente, de não haver necessidade de prolongar o periodo de vegetação, além do suficiente para que a concentração bacteriana atinja o maximo, não sendo mesmo impossivel que, pelo contrário, e de acordo com a impressão de MASON e SCHEUBER, 1936, a permanencia exagerada da cultura em estufa venha a prejudicar a capacidade antigenica do produto final.

Quanto ao papel exercido pela presença de numerosos esporos na vacina, não nos pareceu influente, pois a partida 79, de alto indice de proteção, apresentou-se muito menos esporulada que as duas outras, n.º 80 e 81 da tabela 4; este fato era, aliás, previsivel.

Desta forma, a coincidência de matrizes ricamente esporuladas e subsequentes culturas-vacinas de alta antigenicidade não parece indicar uma relação diréta.

Decorrendo das verificações experimentais reunidas na tabela 4, dois problemas surgiram imediatamente:

O primeiro vinha da admissão de que a exagerada permanencia a 37°C pode realmente prejudicar a antigenicidade do produto final, referindo-se portanto á confirmação desta hipótese, e á necessidade de contornar suas consequencias.

O segundo se relacionava á vantagem real do uso de hemoculturas diretas, como inóculo para as grandes partidas de cultura-vacina.

PORCENTAGEM DE FORMOL E TEMPO DE INCUBAÇÃO

O método que originariamente puzemos em prática, para a obtenção de vacina contra a manqueira, exigia a permanencia em estufa durante um periodo aproximado de 15 dias, sendo á metade desse prazo consumida pelo curso da vegetação, a outra metade pela desvitalização da cultura pelo formól.

Verificada experimentalmente a desnecessidade de periodos de vegetação superiores a 48 horas, desde que se pudesse obter neste prazo vegetação abundante, nossa atenção se voltou para o processo de inativação pelo formól.

Os dados encontrados em literatura, a respeito da quantidade de formól necessaria para tornar regularmente inocua uma cultura virulenta de *chauvoei*, são bastante variaveis. KARMANN, 1927, declara que a taxa de 0,4% de formól não esteriliza a cultura, nem anula sua virulencia; 1,2% do inativante mostrou-se toxico para os animais inoculados. Crê portanto que a melhor taxa de formól é a de 0,6%, embora assim nem sempre evitasse uma virulencia residual. DE BLIECK e JANSEN, 1935, citados por CURASSON, 1936, experimentaram

TABELA 4

Comparação entre vacinas preparadas com amostras reativadas ou de estoque, e entre períodos curtos e longos de vegetação

Tipo	Partida	Data	Vegetação		Transformação em vacina			Inocuidade	Prova de proteção, após 4 semanas		Observações
			Aspecto	Tempo	Curso	Formol °/₀₀	Tempo		Dose vacinante	Resistem a 1DLM	
Reativada	79	22-2-41	Bôa	2 ds	Normal	4°/₀₀	7 ds	Completa	1 cc	16/16	Prova de infeção: A. 77. 1DM = 0,4cc mata 5/5 testemunhas.
Reativada	80	28-2-41	Bôa	8 ds	Normal	4°/₀₀	7 ds	Completa	1 cc	17/19	
Não Reativ.	81	28-2-41	Bôa	8 ds	Normal	4°/₀₀	7 ds	Completa	1 cc	8/20	

OBSERVAÇÃO — As vacinações foram efetuadas simultaneamente. Da mesma forma a ulterior prova de infeção.

TABELA 5

Comparação entre diversas taxas de formol, e diversos períodos de desvitalização

Partida	Data	Vegetação		Transformação em vacina			Inocuidade	Prova de proteção, após 4 semanas		Observações
		Aspecto	Tempo	Curso	Formol	Tempo		Dose vacinante	Resistem a 1DLM	
83	9-4-41	Regular	6 ds	Normal	4°/₀₀	8 ds	Completa	1 cc	21/22	Prova de infeção Virus = A. 77. 1DM = 0,4 cc mata 5/5 testemunhas
84	26-4-41	Regular	2 ds	Normal	2°/₀₀	14 ds	»	1 cc	13/20	
85	26-4-41	Regular	2 ds	Normal	4°/₀₀	7 ds	»	1 cc	11/22	
86	26-4-41	Regular	2 ds	Normal	6°/₀₀	2 ds	»	1 cc	19/22	
87	26-4-41	Regular	2 ds	Normal	8°/₀₀	1 d	»	1 cc	19/19	

OBSERVAÇÃO — As vacinações foram executadas simultaneamente. Da mesma forma a ulterior prova de infeção.

diversas taxas, concluindo que se deve ficar entre 0,5 e 1%. Julgam taxas inferiores a 0,2% ineficientes. Existe ainda um trabalho de KONNO e HASHIMOTO, 1934, infelizmente inacessivel, em que também são estudadas diversas taxas de formól, aliás elevadas. Estes autores compararam a ação de junções desde 0,7% até 1.25%.

De modo geral as junções aconselhadas pelos pesquizadores que não se preocuparam com este aspecto particular do problema ocilam entre 0,4% e 0,6%; SCOTT, 1930, 1932, admite que a presença de formol melhora o efeito imunizante do filtrado de cultura.

Sabendo que a ação do formól está estritamente ligada á composição do meio de cultura utilizado, haviamos chegado de antemão, por tateamentos sucessivos, á verificação de que, para um teor de formol variando de 3 a 4‰ e para o meio de cultura por nós utilizado é indispensável uma permanência de 7 dias a 37°C para que se consiga, certamente, uma inocuidade total da cultura-vacina.

Baseando-nos nessa verificação, estabelecemos a serie de que nos dá conta a tabela 5, em que se variaram dentro de largos limites o teor de formol e a permanencia na estufa, numa relação inversa, dosando-se ulteriormente a potencia antigenica dos preparados assim obtidos.

Dos resultados expostos nesta tabela verifica-se muito claramente que, quando se trata de culturas novas, á medida que diminue o tempo da permanencia da cultura formolada a 37°C, melhoram as condições antigenicas finais da vacina produzida. Aparentemente culturas mais velhas manteem melhor o teor antigenico.

TÉCNICA DO PREPARO DE INOCULOS

Dado que o uso de inoculos constituidos por hemocultura direta de cobaia infectada exige cuidados técnicos especiais, involvendo provas de determinação de pureza que consomem tempo e trabalho apreciaveis, seria desejavel que se pudessem preparar, originando-se de uma matriz assim obtida, o maior numero possivel de partidas de cultura-vacina. Por outro lado, a semeadura de inoculos minimos nas grandes massas de substráto, necessarias para a produção em larga escala, viria prolongar inconvenientemente o periodo de dormencia e, portanto, de vegetação. Podia-se mesmo, com isso, chegar a insucesso completo no desenvolvimento da cultura, pois, mórmente tratando-se de germen anaerobio, é conhecida a necessidade de se lançar mão de inoculos volumosos, para garantir o sucesso da semeadura.

TABELA 6

Comparação entre vacinas obtidas a partir de matrizes enriquecidas ou não.

Tipo	Partida	Data	Vegetação		Transformação em vacina			Inocuidade	Prova de proteção, após 4 semanas		Observações
			Aspecto	Tempo	Curso	Formol	Tempo		Dose vacinante	Resistem a 1DM	
Enriquecida	93	27-9-41	Regular	2 ds	Normal	8‰	1 d	Completa	1 cc	19/20	Virus de prova: A. 77 0,5cc mata 2/5 Testemunhas
Direta	94	6-10-41	Bom	3 ds	»	8‰	1 d	»	1 cc	20/20	
Enriquecida	106	26-5-42	Regular	4 ds	»	8‰	1 d	»	1 cc	Resistem a 0,5cc 8/8 — Resistem a 0,7cc 8/8	Virus de prova: A. 77 0,5 cc mata 3/5 Testemunhas
Direta	107	4-8-42	Bom	3 ds	»	8‰	1 d	»	1 cc	8/8 — 5/8	

TABELA 7

Comparação entre diversos substratos. 2.ª serie

Tipo	Partida	Data	Vegetação		Desvitalização			Inocuidade	Prova de proteção, após 4 semanas		Observações
			Aspecto	Tempo	Curso	Formol	Tempo		Dose vacinante	Resistem a 1DM	
Usual	103	14-2-42	Regular	3 ds	Normal	8‰	1 d	Completa	1 cc	16/16 (5 reações)	
Usual	104	28-2-42	Bom	2 ds	»	8‰	1 d	»	1 cc	16/16 (5 reações)	
VF	110	22-9-42	Franco	3 ds	»	8‰	2 ds	»	1 cc	16/16 (6 reações)	Virus de prova: A. 77 0,5cc = 1DM mata 4/5 Testemunhas
Sangue crú	111	22-9-42	Regular	3 ds	»	8‰	2 ds	»	1 cc	16/16 (7 reações)	
Sangue coz.	112	22-9-42	Regular	3 ds	»	8‰	2 ds	»	1 cc	16/16 (7 reações)	
Carneiro	113	22-9-42	Intenso	3 ds	»	8‰	2 ds	»	1 cc	15/16 (9 reações)	

OBSERVAÇÕES: — As vacinações foram efetuadas simultaneamente. Da mesma forma a ulterior prova de infeção.

No intuito de contornar essas dificuldades contraditórias, estabelecemos novas series comparativas, destinadas a verificar a possibilidade de ser usada, para a semeadura dos grandes balões, não a hemocultura primaria, mas já um repique desta, em pequeno volume (100 a 500cc) do mesmo meio empregado para o preparo da cultura vacina. Duas series foram executadas, e seus resultados estão reunidos na tabela 6.

Embora as consequencias destas duas series não tenham oferecido elementos para uma conclusão inteiramente satisfatoria, mercê da pequena dose de prova de infecção acidentalmente empregada em ambas, deixaram a impressão de que pequena ou nenhuma diferença antigenica existe entre vacinas preparadas diretamente ou com enriquecimento prévio. Dada a grande economia de inóculo primario, e a maior segurança de desenvolvimento da cultura ulterior em grandes massas, este segundo método deve portanto ter preferencia. Aliás, MASON e SCHEUBER, 1936, adotam o mesmo criterio.

TÉCNICA FINALMENTE ESTABELECIDA. PEQUENA INFLUENCIA DO SUBSTRATO.

Seguindo o trajéto e as modificações tecnicas que as experiencias vinham indicando, em fins de 1942 a vacina do Instituto Biologico contra a manqueira atingiu, no que diz respeito á tecnica de seu preparo, uma situação equilibrada e estavel que se vem mantendo até hoje. Ainda uma ultima comparação foi feita, de diversos substrátos, na verdade não mais no intuito de procurar um substituto para o usual, mas para comprovar a conveniencia deste, e para basear melhor a impressão, ha muito formada, de que qualquer substráto capaz de excitar e suportar uma vegetação exuberante do *Clostridium chauvoei* fornece culturas-vacinas de elevado poder antigenico. Esta ultima serie comparativa, efetuada por Dr. V. O. GUIDA, Assistente deste Instituto, forneceu-nos os dados experimentais que estão reunidos na tabela 7.

Embora ainda nesta serie se tivesse lançado mão de uma dose de prova de infecção que, acidentalmente, resultou insuficiente, a analise dos resultados obtidos permite ter-se a ideia que os diversos substratos utilizados se prestavam, de uma maneira bastante homogenea, á confeção de uma vacina eficiente.

Os meios de cultura utilizadas nesta serie foram os seguintes:

1) — O meio usual era constituido, como já descrito, de caldo de carne peptonado a 2%, glycosado a 1%, provido dos sais aconselhados por SCOTT e suple-

mentado pela junção de caldo-figado na proporção de 1:4. Protejia-se contra o oxigenio do ar por uma camada de vaselina semi-solida (vaspar).

2) — O meio VF é o conhecido meio de carne figado, de WEINBERG e GOY.

3) — O meio "sangue crú" e o "sangue aquecido" eram em tudo semelhantes ao meio "usual" alterado apenas pelo acréscimo de 5% de sangue desfibrinado de carneiro; esta junção era efetuada no momento da semeadura, para o meio sangue crú ou imediatamente antes da esterilização, para o meio sangue aquecido. O motivo essencial da introdução destes dois substratos na serie foi a excelente impressão deixada anteriormente pelos substratos contendo peptona de sangue; os resultados dessa junção, entretanto, não corresponderam á espectativa, ficando assim confirmadas observações feitas no mesmo sentido por MASON e SCHEUBER, 1936.

4) — O meio "carne de carneiro" diferenciava-se do usual unicamente pela substituição da carne de bovino, utilizada no preparo do caldo basico, pela carne de ovino. Foi introduzido com base na suposição da possibilidade de existencia de fatores antagonicos á vegetação do *Cl. chauvoei* na carne de bovino adulto, sabidamente tornado refractario á instalação dêste germen. O resultado obtido não justifica esta hipótese.

MODIFICAÇÕES POSTERIORES E SUA INFLUENCIA

As partidas de vacina contra a manqueira, produzidas desde o periodo em que foi efetuada esta ultima serie experimental comparativa, ainda sofreram alterações ocasionais na tecnica de seu preparo, condicionadas porém a circunstancias iniludiveis; assim, a partir de maio de 1943 houve necessidade de substituir a peptona Witte, cujo estoque se exgotara, por peptona nacional Gayer. Finalmente, a partir de setembro de 1944, em virtude de falhas notadas na proteção conferida por algumas partidas, reintroduzimos a pratica de juntar a cada balão de cultura 150 gr de figado, envolto em celofane.

Para que se tenha uma visão de conjunto das partidas preparadas nesta ultima fase, apresentamos na tabela 8 as principais caracteristicas de cada uma delas.

Pode-se notar nesta tabela que a introdução de nova peptona, em substituição á de Witte, trouxe inicialmente notavel baixa, e sempre certa irregularidade do teor antigenico das partidas produzidas. Estas irregularidades cessaram com o acrecimo de figado em celofane.

DISCUSSÃO

Não existem dados seguros que permitam, pelo resultado de provas de proteção de cobaias, em laboratorio, analizar o efeito profilatico de vacinas contra a manqueira, aplicadas a bezerros, no campo. E' ainda dificil, portanto, classificar estes antigenos como máus, bons ou excelentes, de acordo com a resistencia de cobaias por eles vacinadas. Entretanto, embora nos falte o padrão de medida mais con-

TABELA 8

Valor antigenico de vacinas produzidas de Outubro de 1942 em diante

Tipo	Partida	Data	Vegetação		Desvitalização			Inocuidade	Dose vacinante	Prova de proteção, após 4 semanas — Resistem á:				Observações
			Aspecto	Tempo	Curso	Formol	Tempo			DM_{100}	DM_{80}	DM_{60}	DM_{40}	
Pept. Witte	114	12-10-42	Bom	2 ds	Normal	8‰	2 ds	Incompleta (*)	1 cc	—	16/16	—	—	Testemunhas + 4/5
»	115	18-11-42	Mediocre	5 ds	»	8‰	1 d	Completa	1 cc	—	15/16	—	—	
»	116	5-12-42	Regular	3 ds	»	8‰	2 ds	»	1 cc	—	15/16	—	—	
»	117	16- 4-43	Bom	2 ds	»	8‰	1 d	»	1 cc	16/16	—	—	—	Testemunhas + 5/5
Pept. Gayer	118	15- 5-43	Bom	2 ds	»	8‰	2 ds	»	1 cc	11/15	—	—	—	
»	119	24- 5-43	Mediocre	2 ds	»	8‰	1 d	»	1 cc	—	—	9/16	—	Testemunhas + 3/5
»	120	4- 6-43	Regular	2 ds	»	8‰	1 d	Incompleta (*)	1 cc	—	—	7/15	—	
»	121	11- 6-43	Regular	2 ds	»	8‰	1 d	Completa	1 cc	—	—	11/16	—	
»	122	20- 9-43	Bom	2 ds	»	8‰	1 d	»	1 cc	—	—	9/15	—	
»	123	23- 9-43	Regular	5 ds	»	8‰	1 d	»	1 cc	11/15	—	—	—	Testemunhas + 5/5
»	124	29-10-43	Bom	3 ds	»	8‰	1 d	»	1 cc	14/14	—	—	—	
»	125	29-10-43	Bom	3 ds	»	8‰	1 d	»	1 cc	15/15	—	—	—	
»	126	18-12-43	Bom	2 ds	»	8‰	1 d	»	1 cc	19/20	—	—	—	
»	127	18- 1-44	Regular	3 ds	»	8‰	1 d	»	1 cc	18/20	—	—	—	
»	128	26- 1-44	Bom. lerdo	5 ds	»	8‰	1 d	»	1 cc	—	—	17/19	—	Testemunhas + 12/20
»	129	12- 2-44	Bom	2 ds	»	8‰	1 d	»	1 cc	—	—	17/17	—	
»	130	31- 3-44	Bom	4 ds	»	8‰	1 d	»	1 cc	20/20	—	—	—	Testemunhas + 5/5
»	131	20- 5-44	Regular	5 ds	»	8‰	2 ds	»	1 cc	19/19	—	—	—	
»	133	15- 6-44	Bom. lerdo	2 ds	»	8‰	1 d	»	1 cc	17/20	—	—	—	Test. + 10/10
»	134	7- 8-44	Regular	4 ds	»	8‰	1 d	»	1 cc	16/16	—	—	—	
Pept. Gayer + figado	135	15- 9-44	Excelente	2 ds	»	8‰	1 d	»	1 cc	16/16	—	—	—	Testemunhas + 5/5
»	136	20- 9-44	Bom	3 ds	Acidentada	8‰	1+1 d	»	1 cc	16/16	—	—	—	
»	137	30-10-44	Bom	2 ds	Normal	8‰	1 d	»	1 cc	16/16	—	—	—	
»	138	25-11-44	Regular	2 ds	»	8‰	2 ds	»	1 cc	16/16	—	—	—	
»	139	11-12-44	Excelente	2 ds	»	8‰	1 d	»	1 cc	—	19/19	—	—	Testemunhas + 8/10
»	140	15- 1-45	Excelente	3 ds	Acidentada	8‰	1+1 d	»	1 cc	—	19/19			

veniente, que seria a capacidade de tornar imune á doença o animal naturalmente sensivel, não podemos deixar de reconhecer valor inestimavel á prova experimental em cobaia, que escalona os preparados de acordo com seu valor relativo, escalonamento que tem toda probabilidade de ser valido, quando aplicado ao bezerro e em condições naturais.

Ha indicações de ser a proteção do bezerro obtida com maior facilidade que a da cobaia.

Inquerito efetuado um ano após o lançamento de nossa cultura-vacina formolada, respondido por 93 criadores, deu conta dos resultados de 7.074 vacinações, efetuadas em 1931. Houve entre estes vacinados uma unica perda, por brecha de imunidade.

Outro inquerito, efetuado em melhores condições e com maiores precauções, foi lançado em meiados de 1936. Inspetores do Corpo de Veterinarios deste Instituto procuraram 44 criadores, de diferentes zonas do Estado de São Paulo, obtendo destes, diretamente, informações sobre os resultados das vacinações efetuadas durante os anos de 1934 e 1935; foram assim recenceadas 7.221 vacinações, com 5 casos de brecha de imunidade, todos ocorridos numa mesma criação e numa mesma época, seis meses após a data da vacinação.

Embora nenhuma das partidas utilizadas na inoculação dos animais recenceados tenha sido verificada em cobaia, evidenciou-se ulteriormente que partidas feitas de identica maneira conferiam a estes animais uma resistencia muito pouco pronunciada, como se poderá ver na tabela 1 desta publicação.

Aparentemente, portanto, vacinas que conferem excelente proteção ao bezerro ainda não têm as qualidades antigenicas necessarias para conferir á cobaia uma imunidade de gráu elevado.

Partindo dessa probabilidade, podemos admitir que conclusões tomadas da atividade imunizante sobre este animal de laboratorio refletem, com elevado coeficiente de segurança, a atividade sobre o hospedeiro natural da manqueira.

Não se pode declarar que o trabalho aqui discutido tenha sido calcado em verdadeira dosagem da potencia antigenica dos preparados estudados. O que pode ser afirmado é que se procurou sempre determinar o valor antigenico relativo de cada um dos preparados de conjuntos, estabelecidos independente e homogeneamente, com o intuito de esclarecer certa e determinada particularidade técnica. Pôde ficar patenteado qual o melhor elemento de cada conjunto estudado, com base na sua maior eficiencia.

Como consequencia deste estudo, chegamos a adquirir a convicção da possibilidade de dosar com grande exatidão a potencia antigenica de vacinas contra a manqueira, usando processo analogo ao aqui empregado. Das verificações efetuadas nessa direção dará conta uma publicação aparte.

A produção de um antigeno altamente eficiente contra a manqueira não oferece dificuldades extraordinarias. Muito ao contrario, seu segredo parece residir em pequenos detalhes, aparentemente pouco importantes. Reconhecida porém a influencia destes e executado seu tratamento correto, os antigenos resultantes são sempre convenientemente ativos.

Não nos parece necessária, nem justificada, a adopção de processos complicados, numa tentativa de exaltar ainda mais a potencia imunizante dos preparados naturais, seja pela junção de alumen, conforme aconselham e usam MASON e SCHEUBER, 1936, e SCHEUBER, 1944, seja pela de agar ou lanolina, estudados por SCOTT, 1937, seja enfim pela elaborada concentração preconisada por VIEYRA, 1937.

CONCLUSÕES

1) — A composição do substrato de cultura não exerce papel fundamental na preparação de antigenos totais formolados potentes contra a manqueira. Precisa entretanto preencher os requisitos essenciais a uma vegetação precoce e intensa do *Cl. chauvoei*. Como unica exceção a esta regra, a junção de bifosfato de amonio, bicarbonato de potassio, citrato ferrico e citrato de potassio, preconisada por SCOTT, mostrou-se benefica.

2) — A permanencia a 37°C deve ser reduzida a um minimo, essencial para bom desenvolvimento e subsequente desvitalização pelo formol. Periodos de vegetação de 48 horas a 72 horas são, na maioria dos casos, suficientes. O formol a 0,8% desvitaliza a cultura em 24 horas, a 37°C.

3) — Culturas altamente virulentas, recentemente passadas em animal, formam vacinas de teor antigenico mais elevado que culturas de estoque.

4) — A vacinação e subsequente prova da imunidade de lotes de cobaias provou ser de utilidade para a avaliação da potencia dos antigenos.

Deixamos aqui registrados nossos agradecimentos a L. G. Vasconcelos, cujo auxilio técnico eficaz tornou possivel a realização deste

trabalho; a Dr. V. O. Guida que se encarregou de efetuar uma das series experimentais; ao Dr. V. Carneiro que nos proporcionou valiosa ajuda na redação dos originais; a R. L. Araujo por seu auxilio na redação do resumo em inglez.

STUDIES ON BLACK-LEG: — PREPARATION AND CONTROL OF FORMOLIZED VACCINE.

Abstract

As a consequence of fifteen years of practice in the preparation of a formol-vaccine against black-leg, some significant points could be well established, whose influence upon the results proved to be capital. At the same time, other points formerly considered to be very important were demonstrated to have a minor influence.

The composition of the substrata employed for the preparation of the vaccine was found to be irrelevant, provided that it presented the faculty of permitting a luxuriant and quick growth of Cl. chauvoei. Many different media were verified to be able to do so. Nevertheless, the addition to the substratum of ammonium biphosphate, potassium bicarbonate, ferric citrate and potassium citrate, as advised by Scott, led to the obtention of antigens of a superior quality.

The permanence of the culture in the incubator at 37°C. is, to a certain extent, injurious to the chauvoei antigens. It should, therefore, be the shortest possible. Growth periods of 48 hours were found to be largely sufficient for permitting the culture to attain its maximum concentration.

Formalin at a concentration of 0.8% succeeds in devitalizing the cultures, after 24 hours at 37°C.

The total permanence of the culture in the incubator can therefore be shortened to about 72 hours, a period which is not yet perceptibly noxious.

It was also verified that the use of highly pathogenic strains, whose virulence had recently been increased by passage through guinea-pigs, is very important for the obtention of potent antigens.

The antigenic potency of the vaccines could be estimated with reasonable accuracy by the vaccination of lots of selected albino guinea-pigs and ulterior test against a highly virulent strain of Clostridium chauvoei.

BIBLIOGRAFIA

BASSET, J. e R. PAILLE — 1930 — Preparation de la toxine destinée à la vacination contre le charbon symptomatique. *Comptes Rendues des Societés de Biologie*, Paris, 103: 250-251.

BERG, W. N. — 1924 — 12% Dextrose media for prolonged anaerobe growth. *Proceed. Soc. for exper. Biol. med.*, 22: 91-92.

BOSWORTH, T. J. — 1930 — Black Leg (Vaccination). *Rept. 11 th Intern. Veter. Congress, London*, 3: 199-212.

BRAGA, A. — 1942 — Soros, vacinas, alérgenos e imunigenos. Tomo 3: 29-57. *Serviço de Informação agricola*, Min. da Agr., Rio de Janeiro.

CORDIER, G. — 1926 — Essais d'immunization contre le charbon symptomatique. *C. R. Soc. Biol.*, Paris, 95: 848-850.

CURASSON, G. — 1936 — Traité de Pathologie Exotique, 2: 113-123. Ed.: Vigot Frères, Paris.

DACORSO FILHO, P. — 1940 — Contribuição ao Estudo da Estandardização da vacina contra o carbunculo sintomatico. *Tese. Escola Nacional Veterinaria.* Rio de Janeiro.

DE BLIECK, L. e J. JANSEN, — 1937 — Onderzoek naar de waarde van het boutvuur formolvaccin bij Huisdieren. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 64: 513. Referencia em *Centralblatt f. Bakter.*, ref. 1937, 127: 225.

FREI, W. e L. RIEDMÜLLER — 1938 — Gleichzeitige aktive Immunizierung gegen Rauschbrand und malignes Oedem mit abgetöteten Vollkulturen. *Berliner Tierärztl. Wochenschr.*, p. 45-49.

GODOY, A. — 1910 — Nova vaccina contra o carbunculo symptomatico. *Memorias Inst. Osw. Cruz*, 2: 11-21.

GOMES DE FARIA, J. — 1908 — Contribuição ao estudo do carbunculo sintomatico. *Tése*, Rio de Janeiro.

GOSS, L. W. e J. P. SCOTT — 1918 — Standartization of Black-leg vaccine. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 54: 234-43.

GRAUB, E. e W. ZSCHOKKE — 1936 — Die Erfahrungen mit der keimfreien Filtratimpfung gegen den Rauschbrand. *Schweizer Arch. Tierheilk.*, 78: 97.

GREEN, W. G. B. — 1929 — Immunization against Anaerobes of the Gas gangrene Type in South Africa, by means of "Anatoxins". *15 th Rept. Veter. Research*, South Africa, p. 193-221.

HENDERSON, D. W. — 1932 — Studies on Clostridium chauvoei: I — The Analysis of the "H" and "O" Antigens of Cl. chauvoei. *Brit. J. Exper. Pathology*, 13: 412.

HENDERSON, D. W. — 1932 — Studies on Clostridium chauvoei: II — Active immunization with pure "O" Antigen. *Brit. J. Exper. Pathology*, 13: 421.

HENDERSON, D. W. — 1933 — Studies on Clostridium chauvoei: III — Passive Protection with pure "O" Sera. *Brit. J. Exper. Path.*, 14: 108-12.

KARMANN, P. — 1927 — Immunizierungsversuche bei Gasoedemen. 12. Tagung der Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie, in Wien. *Centr. f. Bakteriol.*, I, Orig., 104: 171-172.

KONNO, T. e K. HASHIMOTO — 1934 — Ueber die Bedeutung von formolisierten Rauschbrand Kulturen zur Schutzimpfung. *J. Japan. Soc. Veter. Science*, 13: 19-38. Referencia em *Centralb. f. Bakteriol.*, Ref., 1935, 118: 449.

LACERDA, J. B. — 1889 — A Peste de manqueira na Provincia de Minas Geraes (carbunculo symptomatico). *Relatorio, Imprensa Nacional*, Rio de Janeiro.

LECLAINCHE, E. e H. VALLÉE — 1925 — Sur la vaccination contre le charbon symptomatique. *C. R. Soc. Biol., Paris*, 92: 1273.

MANNINGER, R. — 1924 — Beitrag zur Aetiologie und Prophylaxe des Rauschbrandes und des malignen Oedems der Wiederkäuer. *Centralb. f. Bakteriol.*, I, O., 92: 418-24.

MARTIN, L. A. — 1938 — Culture de Clostridium chauvoei et preparation d'un vaccin contre le charbon symptomatique. *C. R. Soc. Biol.*, Paris, 127: 1059-1061.

MASON, J. H. e J. R. SCHEUBER — 1936 — The Production of Immunity to Cl. chauvoei. *The Onderstepoort Journal*, 7: 143-165.

MC EWEN, A. D. — 1926 — Quarter-evil and braxy; Studies concerning immunity. *J. of Comp. Pathol. Therap.*, 39: 253-83.

NITTA, N. — 1918 — Investigations on Black-leg Immunization. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 6: 466-482. Referencia em *Bull. Inst. Pasteur*, 1918, 16: 589.

ROCHA LIMA, H. — 1906 — Peste da manqueira, ou carbunculo symptomatico. *Publicação do Instituto Oswaldo Cruz*, Besnard. Fréres, Rio de Janeiro.

SCHEUBER, J. R. — 1931 — Black-quarter and Malignant Oedema. A new method for the Preparation of a Bivalent Vaccine against Bac. chauvoei and Vibrion Septique. *17 th Rept. Dir. Vet. Ser. Anim. Ind.*, Union of South Africa, 193-196.

SCHEUBER, J. R. — 1944 — Some Remarks on Black Quarter Vaccines. *Onderstepoort Journal of Vet. Ser. Anim. Ind.*, 19: 17-22.

SCHMIEDHOFER — 1932 — Schutzimpfung gegen Rauschbrand mit Formolvakzine nach Leclainche u. Vallée. *Deut. Tierärztl. Wochenschrift*, p. 545-547.

SCOTT, J. P. — 1923 — Black-leg Vaccines: their Production and Use. *Technical Bull. n.º 10*, Kansasi Agricultural College, Manhattan.

SCOTT, J. P. — 1930 — The use of Salts in the Production of Black-leg Filtrate and Bacterin. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 76: 525-37.

SCOTT, J. P. — 1930 — Action of formaldehyde on the aggressive Substance of Black-leg filtrate, bacterin and aggressin. *Journ. of Infec. Diseases*, 46: 460-68.

SCOTT, J. P. — 1932 — Black-leg Immunization. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 80: 848-862.

SCOTT, J. P. — 1937 — The action of Preservatives and Salts on Black-leg Cultures. *J. Infec. Dis.*, 61: 103-109.

SCOTT, J. P., A. W. TURNER e L. R. VAWTER — 1934 — Gas Oedema Diseases. *Rept. 12 th Intern. Cong.*, New York., 2: 168-182.

UCHIMURA, Y. — 1921 — Zur Frage der Rauschbrandschutzimpfung. *Schweiz. Archiv Tierheilk.*, 63: 58.

UENAKA, S. — 1938 — Ueber die immunisatorische Einteilung von Rauschbrand und Pararauschbrandbazillen. *Zeitschrft. Immunitätsf.*, 93: 236-40.

VIEYRA, O. — 1937 — Concentration de la vacina contra el carbunculo sintomatico (La Mancha) por medio del sulfato de sodio. *Rev. Med. Vet.*, B. Ayres, 19: 396-400.

VILJOEN, P. R. e J. R. SCHEUBER — 1927 — Black Quarter in South Africa: With Special Reference to improved methods of inoculation. *11 th and 12 th Rept. Director Vet. Educ. Research*, Union of South Africa, 501-570.

VISWANATHAN, G. R. — 1936 — Prevention of Black Quarter in India and the Organisms responsible for this Condition. *Proceed. Animal Husb. a. Res. Wkrs.*, Conf. India, p. 61-63.

ESTUDOS SÔBRE A "MANQUEIRA"
DO VALOR ANTIGENICO DE TRES TIPOS DE VACINA

POR

C. Rodrigues

Do Instituto Biologico de S. Paulo

A imunidade contra a manqueira é hoje promovida geralmente pelo uso da vacinação intensiva, lançando-se mão de um dos quatro seguintes antigenos:

a) — Culturas vivas, atenuadas de forma a se tornarem avirulentas.

b) — As chamadas agressinas naturais.

c) — Filtrados de culturas artificiais, formolados ou não.

d) — Culturas totais mortas pelo formol.

O primeiro método, originario de KITASATO, 1889, e desenvolvido por GOMES DE FARIA, 1908 e por GODOY, 1910, veiu substituir, com as vantagens facilmente perceptiveis, os antigos sistemas de inoculação de esporos atenuados, dissecados e aquecidos, obtidos de exsudados de animais infectados ou de cultura. Esta técnica, por muito tempo constituiu o unico meio disponivel de vacinação contra o *Cl. chauvoei*; eram a dupla vacina tipo Lyon, de ARLOING, CORNEVIN e TOMAS, 1887, e suas diversas modificações, apoiadas no uso de liquidos organicos; ou os dois tipos do chamado "Emphysarcol" de FOTH, 1918, cultura artificial atenuada por aquecimento, precipitada e seca.

Aparentemente, no momento atual, o uso de culturas totais atenuadas limita-se ao Brasil e às Republicas sul-americanas visinhas, onde tem larga divulgação a vacina tipo Manguinhos: cultura atenuada por vegetação prolongada em caldo-soro-glicosado.

As chamadas "agressinas naturais", constituidas de liquido de edema de animais natural ou artificialmente infectados, libertado de germens por filtração, teem seu poder imunizante registado desde ROUX, 1888, mas só começaram a ter difusão com os trabalhos de SCHÖBL, 1910 e seguintes. Sua popularidade nunca muito pronunciada, tende a restringir-se cada vez mais, devido essencialmente ás dificuldades tecnicas e economicas de sua produção, e á deshumanidade nesta implicada. Não obstante, este antigeno teve temporaria aplicação na Africa do Sul, segundo VILJOEN e SCHEUBER, 1927; foi também utilizado na Suissa, na India e, principalmente, nos Estados Unidos da América do Norte, onde, segundo BOSWORTH, 1930,

foi usado em larga escala; ainda em 1940 era ali preparado por uma firma industrial, conforme informação de LIVE. A tendencia geral, entretanto, é para abandonar o uso deste antigeno.

Já os filtrados de cultura, que constituem o terceiro tipo acima enumerado, têm tido aplicação muito mais ampla. Desde ROUX e CHAMBERLAND, 1887, é conhecida a capacidade destes filtrados, de promoverem imunidade contra a manqueira. A divulgação de seu uso se deve entretanto a NITTA, 1918, no Japão, EICHHORN, 1918, na America do Norte e a GRAUB e ZSCHOKKE, 1920 na Suissa. Seu uso mantem-se ainda hoje frequente e disseminado. Empregam-se em natureza ou após formolação, pois a adição de formol, segundo LECLAINCHE e VALLÉE, 1925, contribue para melhoria da potencia antigenica.

SCOTT, em 1931, estudando comparativamente a "agressina natural" e o filtrado de cultura, teve a impressão de serem equivalentes, no que se relaciona com substancias antigenicas; informou ainda que ambos produzem duradoura imunidade.

As culturas totais formoladas, que representam o quarto tipo de vacina contra a manqueira, teem ganho rapida difusão nos ultimos 20 anos. Devem sua origem a LECLAINCHE e VALLÉE, 1925, e foram em seguida particularmente estudadas por numerosos autores: na Inglaterra por MC EWEN, 1926; na Africa do Sul por GREEN, 1929 e por MASON e SCHEUBER, 1936; na America por BOSWORTH, 1930 e por SCOTT, 1932; na Hungria por SCHMIEDHOFER, 1932; entre outros.

No Instituto Biologico se produz e distribue, desde 1930, uma vacina contra a manqueira, que se filia a este ultimo tipo.

A presente comunicação diz respeito a uma comparação entre a potencia antigenica dos tres tipos de vacina mais comumente usados, isto é, filtrados de cultura, culturas totais mortas, e culturas totais atenuadas; esta comparação foi efetuada por meio de prova simultanea de proteção a lotes de cobaias.

VACINAS ANALIZADAS

Para a comparação acima referida dispuzemos das seguintes vacinas:

a) — Culturas vivas, atenuadas de forma a se tornarem avirulentas:

I) — Vacina	0490	Vacinas de 5 diferentes fabricantes, recolhidas no mercado, que se verificou conterem germens vivos, caracterizados como *Cl. chauvoei.*
II) — "	0491	
III) — "	0492	
IV) — "	0494	
V) — "	0496	

VI) — Vacina Mq 90 — Vacina preparada por nós, como termo de comparação. Tratava-se de uma cultura envelhecida da amostra 43, reativada, usualmente empregada para o preparo da vacina formolada habitual. Obtida por cultura durante 12 ds., a 37° C, em caldo figado.

Embora esta vacina se mostrasse inocua, quando provada sua virulencia pela inoculação de 3 cc em duas cobaias, no momento ulterior de serem efetuadas as inoculações para prova de potencia antigenica ela ainda apresentava uma patogenicidade residual acentuada.

b) — Culturas totais, mortas pelo formol:

I) — Vacina 0493 } Vacinas de 2 diferentes fabricantes, recolhidas no
II) — " 0495 } mercado, verificadas como estereis e apatogenicas.

III) — " Mq 92 }
IV) — " Mq 117 } Partidas normais de vacinas preparadas no Instituto Biologico, de acordo com tecnica recentemente descrita.
V) — " Mq 139 }
VI) — " Mq 140 }

c) — Filtrados formolados:

I) — Olc } Recebidos do estrangeiro.
II) — F }

As vacinas dadas como constituidas por germens vivos foram verificadas, quanto á vitalidade, e á ação patogenica dos germens, seja na forma em que constituiam as vacinas, seja após subcultura em meio conforme Tarozi. Todas, com exceção de 0490, demonstraram-se constituidas de emulsões vivas de *Cl. chauvoei*, em estado de pureza e incapazes de provocar a morte de cobaias inoculadas, quer com 3cc da vacina original, quer com 1cc de cultura de 24 horas em Tarozzi, do germen isolado.

Fez exceção a esta regra a vacina que recebeu o n.° 0490, também adquirida no mercado e que se demonstrou constituida, em estado de aparente pureza, por um germen de caracteres intermediarios entre o *Cl. chauvoei* e o *Cl. welchii*. Embora apatogenica, quando inoculada diretamente, esta vacina forneceu, já na primeira passagem por Tarozzi, uma cultura fortemente virulenta, matando a cobaia com lesões de gangrena gazoza hemorragica, não muito diferentes das que normalmente se observam na infecção pelo *Cl. chauvoei*. Não ficou elucidado si aí se tratava de uma mistura de dois germens, mas, a julgar pelas provas de pureza e, subsequentes, de proteção, maior é a probabilidade de estar em causa um microorganismo especial.

Para afastar a hipotese, aliás pouco provavel, de diferenças antigenicas entre a amostra empregada na confecção da vacina habitual de nosso Instituto e as empregadas por outros fabricantes, preparamos também, com a nossa amostra, uma vacina atenuada experimental. Não empregamos para esse efeito nem temperatura elevada de vegetação, nem a ação do sôro normal de cavalo. Deixamos sim-

plesmente que uma cultura de nossa amostra 43, em meio rico, permanecesse na estufa a 37°C até perda aparente da virulencia, verificada pelo insucesso da inoculação de 3cc em cobaia.

Como se verá nos protocolos experimentais, esta prova não foi, de nenhuma maneira, suficiente, pois ocorreram varios acidentes de vacinação com o antigeno assim preparado.

Além desta, outra diferença substancial entre a vacina atenuada que preparamos e as comuns no mercado é que os germens isolados destas se mantem avirulentos, pelo menos na primeira passagem, ao passo que a atenuação conseguida na partida Mq 90 foi de caracter transitorio. Na admissão, entretanto, de que esta atenuação incompleta só poderia contribuir para manter a qualidade antigenica do produto final, incluimos a vacina Mq 90 nesta serie, como aliás em outras posteriormente realizadas.

As vacinas mortas, constituidas de culturas formoladas, fogem, naturalmente, a uma análise acurada. Apenas pudemos registar serem constituidas de bastonetes esporulados, serem totalmente estereis, e inócuas.

Os dois filtrados de cultura formolados que pudemos obter para nossas verificações nos foram gentilmente enviados pelo Dr. OLCESE, Republica Argentina, a quem deixamos aqui consignado nosso agradecimento.

No Brasil não se preparam nem se usam vacinas deste tipo, ao que saibamos.

Pudemos verificar que estes filtrados eram estereis e, aparentemente, isentos de germens. Sua inocuidade não pôde ser controlada, pois o volume á nossa disposição era restricto.

RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Nossas provas comparativas consistiram na inoculação, em lotes de 20 cobaias, de cada um dos produtos analizados, e verificação simultanea da imunidade provocada, após um mês de espera.

Ha certa disparidade entre as doses aconselhadas pelos fabricantes, para a vacinação de bovinos. Alguns aconselham o emprego de 1cc, outros o de 2cc. Como não encontramos nenhuma indicação experimental quanto à conveniencia do uso de uma ou outra dessas quantidades, supomos que sua indicação é orientada, essencialmente, por fatores economicos; resolvemos portanto tomar doses identicas para todas as vacinas comparadas, tendo-nos decidido pela de 1cc, já

ha muito empregada nas provas de imunidade contra a manqueira, aqui efetuadas.

Apenas na comparação dos filtrados com as vacinas deste Instituto, isto é, com culturas totais formoladas, fomos obrigados, em virtude da exigua quantidade de filtrados obtida, a empregar como dose do antigeno apenas 0,5cc, sem que com isso tenha ficado prejudicada a comparação, como se verá.

Para a prova de infecção empregamos a nossa amostra de *Cl. chauvoei* n.º 77, de origem bovina, obtida por obsequio de Henderson, Instituto Lister.

Os resultados obtidos nas duas series experimentais executadas, uma comparando vacinas totais vivas e mortas, outra comparando vacinas mortas e filtrados, estão dispostos nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Verifica-se pelo exame da tabela 1 que não ha diferença evidente entre a capacidade imunizante de vacinas vivas ou mortas, ou pelo menos, que ambas fornecem imunidade elevada.

E' claro que o método de comparação utilizado não permite medir com precisão o grau de imunidade obtido. Mas deixa ver claramente que essa imunidade é sempre bôa. Os casos de fracasso completo, um de vacina viva e outro de vacina morta, decorrentes sem duvida de técnica de preparo defeituosa, tornaram-se uteis para a demonstração da severidade do test.

A tabela 2 nos indica claramente a possibilidade de obtenção de filtrados de cultura formolados, aparentemente livres de germens e capazes de induzir imunidade. Assim, em igualdade de volume, o filtrado 0lc. forneceu um indice de proteção analogo ao apresentado pela cultura total 139. O outro filtrado experimentado não protegeu ou, pelo menos, não provocou imunidade verificavel pelo método de prova utilizado. E' dificil dicernir, neste caso, entre defeito de fabricação e impropriedade do antigeno, dado o numero restrito de amostras de filtrado submetidas á analize.

DISCUSSÃO

A padronização de um método de preparo de vacina contra a manqueira, isto é, a eleição de um tipo de vacina universal, tem um alcance consideravel. Não só viria facilitar o progresso e a aplicação deste antigeno, como permitiria maior exatidão nas comparações entre preparados de diversas origens, e um sistema de aferição generalizado.

TABELA 1

Provas comparativas de proteção entre vacinas vivas e mortas.

Amostra	Prazo de Utilização	Tipo	Esterilidade	Inocuidade		Dose bovino	Proteção de cobaias contra 1DM 80%, por		
				Vacina	Cultura		1 dose bovino	½ dose bovino	¼ dose bovino
0490	Sem prazo	Viva, atenuada	Cultura pura, atipica	apatogenica	patogenica	1 cc	2/20 (**)	—	—
0491	Nov. 1941	Idem	Cultura pura	»	apatogenica	1 cc	17/20	—	—
0492	Jun. 1942	Idem	Idem	»	»	1 cc	20/20	—	—
0494	Maio 1942	Idem	Idem	»	»	1 cc	19/19	—	—
Mq 90	Jul. 1942	Idem	Idem	virulencia (*) residual	patogenica	—	—	18/18 (1cc)	—
0493	Set. 1944	Morta formolada	Esteril	apatogenica	—	2 cc	—	3/20	—
0495	Out. 1942	Idem	Idem	»	—	1 cc	20/20	—	—
Mq 92	Out. 1942	Idem	Idem	»	—	2 cc	—	20/20	—

Vacinação efetuada em 12-8-41 — Prova de infecção em 12-9-41.
Testemunhas, recebendo 0,5 cc de virus — morrem 8/10.
(*) A vacina Mq 90 provocou dois acidentes de vacinação, mortais.
(**) Numero de cobaias protegidas/numero de cobaias provadas.

TABELA 2

Provas comparativas de proteção entre vacinas mortas e filtrados

Amostra	Prazo de Utilização	Tipo	Esterilidade	Inocuidade	Dose bovino	Proteção de cobaias contra 1DM 80%, por		
						1 dose bovino	½ dose bovino	¼ dose bovino
Mq 139	24-1-46	Cultura formolada	Incompleta (*)	Apatogenica	2 cc	—	19/19 (**)	17/20
Mq 140	6-2-46	» »	Completa	»	2 cc	—	19/19	20/20
01c	1-10-46	Filtrado formolado	»	—	1 cc	—	16/19	—
F.	29-10-45	» »	»	—	1 cc	—	6/20	—

Data da vacinação = 3-2-45 = Prova de infecção: 7-3-45.
Testemunhas, recebendo 0,7 cc de virus = morrem 8/10.
(*) Ulteriormente se verificou que a vacina mq 139 ainda continha *Cl. chauvoei* viavel.
(**) Numero de cobaias protegidas/numero de cobaias provadas.

Encarado sob muitos aspectos, e antes de qualquer verificação experimental comparativa, o uso de antigenos desvitalizados e, portanto, menos sucetiveis de alteração, suplanta o de antigenos vivos. Por outro lado, a simplicidade técnica do preparo coloca as culturas totais mortas em nivel superior ao dos filtrados, quer naturais, quer artificiais.

Entretanto, torna-se evidentemente necessario um estudo cuidadoso da qualidade de cada um dos tipos de antigeno hoje em voga, para que se possam estabelecer com rigor as vantagens e desvantagens de cada um, de modo a se ficar em posição de eleger um tipo, em detrimento dos demais, ou de reconhecer a impossibilidade de tal eleição.

As experiencias que são objeto desta comunicação sucederam a um longo periodo de aperfeiçoamento de culturas-vacinas formoladas, que constituem a vacina distribuida pelo Instituto Biologico de São Paulo aos criadores, para a prevenção da manqueira. Chegou-se afinal a uma homogeneidade de produção e de qualidade antigenica das partidas que justificam a idéia de poderem ser nossos resultados obtidos por quem o quiser.

Dado que quase toda nossa experiencia é baseada, não no resultado de observações feitas em pequena escala, no laboratorio, mas em produção semi-industrial, ha motivo para supôr que se aplique, igualmente, a instalações de produção massiça.

Supuzemos, por isso, interessante e conveniente a contraposição destas culturas-vacinas, assim obtidas, aos dois outros tipos de vacina contra a manqueira existentes, seja o filtrado, seja a cultura viva, atenuada, no que se refere á imunidade imediatamente induzida em cobaias. Ficou excluida nesta comparação a "agressina natural", que segundo SCOTT, 1931, é indiferençavel dos filtrados de cultura quanto á qualidade antigenica, e que, por motivos obvios, é seriamente inconveniente.

Os resultados obtidos nesta comparação nos pareceram inteiramente satisfatorios, no sentido de deixar demonstrado que a imunidade que a cultura total formolada provoca é de teor comparavel ao da desenvolvida pelas culturas atenuadas, e talvês superior á que nos apresentam os filtrados de cultura formolados.

Aliás, as conclusões referentes ao filtrado confirmam, entre outras, as observações relatadas por BOSWORTH ao Congresso de Londres, 1930, e, mais recentemente, as efetuadas por MASON e SCHEUBER, 1936 e por SCHEUBER, 1944.

Encontram-se em literatura dados quanto à durabilidade da proteção conferida por filtrados e por culturas mortas, quer isoladamente, quer estudados em comparação. Assim WOLTERS, 1930, declara que a cultura formolada proteje durante 9 mezes, no minimo. KONNO e HASHIMOTO, 1935, julgam que a duração da imunidade conferida pela cultura formolada, não menor que a dos filtrados, dura 8 meses. SCHMIEDHOFER, 1932, julga, em relação a este detalhe, a cultura um pouco superior ao filtrado; a primeira protegeria por 8 mezes, o filtrado apenas por 6. SCHEUBER, em 1944, confirma esta verificação de SCHMIEDHOFER. Entretanto, VILJOEN e SCHEUBER em 1927 afirmaram ser superior a 1 ano a duração da imunidade conferida pelo filtrado.

Comparações da duração da imunidade produzida por culturas formoladas, de um lado, e cultura atenuada, de outro, não existem ainda. Experiencias por nós efetuadas, em carneiros, não chegaram a resultado digno de apreciação, pois muitos dos animais se perderam no decurso da prova, seja por doença intercurrente, seja por acidente fortuito. Essa serie visava comparar a duração da imunidade provocada pela inoculação de cultura morta, formolada e cultura viva, atenuada. Os animais inoculados com esta ultima perderam-se, totalmente. Os que receberam cultura morta atingiram, embora em numero reduzido, a fase final da experiencia; mas, os resultados paradoxais da prova de infecção deixaram-nos a impressão de serem os animais empregados muito irregulares, seja na sua capacidade para reagir á inoculação do antigeno, seja na sua sucetibilidade á infecção.

Dado que bezerros adquirem naturalmente imunidade, com o crecimento, e que cobaias dificilmente sobrevivem ao largo periodo necessario á execução de uma prova desta natureza, parece-nos dificil chegar a obter dados experimentais que permitam julgar da duração da imunidade conferida pelos antigenos vacinantes contra a manqueira.

Nada indica entretanto, que a duração da imunidade decorra de qualidade especial da vacina. Ao contrario, é inteiramente de esperar que dependa exclusivamente da capacidade de reação do paciente, e da quantidade e estado fisico do antigeno especifico inoculado. E' provavel que antigenos bacterianos figurados, em consequencia de sua absorção e eliminação mais lenta, sejam capazes de promover melhor e mais duravel imunidade, por serem melhor aproveitados. Quanto à vacinação com germens vivos, esta imunidade dependerá, evidentemente, do seu comportamento no organismo. Esse

comportamento não foi ainda convenientemente estudado, mas as observações de DE MOULIN, 1939, indicam a probabilidade de serem esses germens fagocitados e destruidos.

SUMÁRIO

Neste trabalho procurou-se confrontar a capacidade vacinante de diversos tipos de antigeno correntemente usados para a vacinação contra a manqueira.

E' indubitavelmente do maior interesse a comparação entre as qualidades dos diversos tipos de vacina contra a manqueira ora em voga, no sentido de tornar possivel a sua seleção. Entre estas qualidades, o valor antigenico está, naturalmente, em primeiro plano.

Os tipos de vacina aqui considerados abranjem a quasi totalidade dos que teem emprego na pratica. São: o filtrado de cultura artificial, a cultura total formolada e a cultura viva, atenuada.

Encontram-se em literatura dados comparativos quanto ao comportamento dos dois primeiros antigenos citados. Ainda não existiam informações sobre a capacidade antigenica da cultura viva, atenuada, tal como é de uso frequente no Brasil e outros países da America do Sul, em confronto com os demais tipos de vacina.

Para nossas comparações, utilizamos um método de verificação apoiado na resistencia adquirida por grupos de cobaias vacinadas.

Os resultados obtidos evidenciaram equivalencia de poder antigenico de culturas formoladas e culturas vivas, atenuadas, tendo ambas demonstrado uma alta capacidade vacinante. Um dos filtrados de cultura provados apresentou-se apenas ligeiramente menos potente que as culturas totais. O outro não conferiu nenhuma proteção.

CONCLUSÃO

A imunidade contra a manqueira, conferida pela inoculação de culturas vivas, atenuadas, ou de culturas mortas, formoladas, é de nivel semelhante.

Podem ser obtidos filtrados de cultura formolados capazes de dar imunidade de nivel aproximado ao das vacinas figuradas.

Deixamos aqui consignados nossos agradecimentos a L. G. VASCONCELOS, pela sua ajuda técnica, ao Dr. VITOR CARNEIRO, que gentilmente reviu os originais, e a R. L. ARAUJO, por seu auxilio na redação do resumo em inglez.

STUDIES ON BLACK-LEG: ON THE ANTIGENIC VALUE OF THREE TYPES OF VACCINES

Abstract

Various types of vaccines, intended for cattle protection against black-leg, can be found on the market. Those which stand in a more conspicuous position are: a) the formolized whole culture; b) the attenuated virus, constituted by viable cultures, rendered apathogenic by some procedure; c) the germ-free culture filtrate, formolized or not.

We were naturally interested in ascertaining the relative value of each one of these three types of vaccines, obtained by different techniques, in order to weight their comparative value and to be in a position to choose among them. The capacity of inducing greater or lesser immunity response in inoculated animals is evidently the best judge of their merits.

The results of such a comparison are here presented.

Lots of 20 guinea-pigs were inoculated with the same volume of each type of the three mentioned vaccines; the sensitivity of these vaccinated guinea-pigs against one and the same dosis of a highly virulent culture of Cl. chauvoei was afterwards tested.

As a result of our experiments, we could reach the conclusion that both the formolized whole culture and the attenuated virus could induce in the guinea-pigs an immunity of high level from the infection by Cl. chauvoei, by the inoculation of one dosis of 1 cc. No superiority was observed between them.

It became also apparent, from the analysis of two formolized culture filtrates, that one of them did provide an immunity of some degree, almost comparable to that obtained by the use of bacterial vaccines. The other culture filtrate proved inactive.

BIBLIOGRAFIA

Arloing, Cornevin e Tomas — 1887 — Le charbon symptomatique du boeuf. Asselin e Honzeau, Paris, 2.ª ed.

Bosworth, T. J. — 1930 — Black leg (Vaccination). *11th Intern. Veter. Congress*, London, 3: 199.

De Moulin, F. W. K. — 1939 — Onderzooek naar der aard der immuniteit tegen boutvuur. *Ned.-Ind. Blad Diergeneesk.*, 2: 35-61. Resumo em *Veterinary Bulletin*, 10: 748.

Eichhorn, A. — 1918 — Studies in Black-leg Immunization, with special reference to Black-leg Filtrate. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 5: 653-59.

Foth, H. — 1916 — Ein neuer Rauschbrandimpfstoff (Emphysarcolum siccum Foth). *Berl. Tierärztl. Wchsch.*, n.º 11, citado por Kolle, Kraus & Uhlenhuth, 4: 1213-1268. (1928).

GODOY, A. — 1910 — Nova vaccina contra o carbunculo symptomatico. *Memorias Inst. Osw. Cruz*, 2: 11-21.

GOMES DE FARIA, J. — 1908 — Contribuição ao estudo do carbunculo symptomatico. *Tése*. Rio de Janeiro.

GRAUB, E. e W. ZSCHOKKE — 1920 — Die Immunisierung gegen Rauschbrand mit keimfreien Filtraten. *Berl. Tierärztl. Wochens.*, p. 99, e *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 62: 52-65 e 112-122.

GREEN, W. G. B. — 1929 — Immunization Against the Anaerobes of the Gas Gangrene Type in South Africa by means of "Anatoxins". *15 th Rept. of the Dir. Vet. Serv. South Africa*, p. 193-221.

KITASATO, S. — 1889 — Citado por J. P. Scott, *J. of Bacter.*, 10: 265-313. (1925).

KONNO, T. e K. HASHIMOTO — 1934 — Über die Bedeutung von formolisierten Rauschbrandkulturen zur Schutzimpfung. *Journ. Jap. Soc. Veter. Science*, 13: 19-38. Resumo em *Centr. Bakter.*, ref. 118: 499. (1935).

LECLAINCHE, E. e H. VALLÉE — 1925 — Sur la vaccination contre le charbon symptomatique. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 92: 1273.

LIVE, I. — 1940 — Studies with Clostridium chauvoei aggressin. *Journ. of Immunol.*, 39: 137-62.

MAC EWEN, A. D. — 1926 — Quarter-evil and braxy; studies concerning immunity. *J. Comp. Path. Therap.*, 39: 253-83.

MASON, J. H. e J. R. SCHEUBER — 1936 — The production of Immunity to Clostridium chauvoei. *The Onderstepoort Journ.*, 7: 143-65.

NITTA, N. — 1918 — Investigations on Black-leg Immunization. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 6: 466-82.

RODRIGUES, C. — 1945 — Estudos sôbre a manqueira: Do preparo e controle da vacina formolada. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 16:

ROUX, E. — 1888 — Immunité contre le charbon symptomatique conferée par des substances solubles. *Ann. Inst. Pasteur*, 2: 49.

SCHEUBER, J. R. — 1944 — Some Remarks on Black-quarter Vaccins. *Onderstepoort Journ. Vet. Sci. Animal Ind.*, 19: 17-22.

SCHMIEDHOFER — 1932 — Schutzimpfung gegen Rauschbrand mit Formolvakzine nach Leclainche und Vallée. *Deut. Tierärzt. Wochens.*, p. 545-547.

SCHOBL, O. — 1910 — Über Aggressinimmunizierung gegen Rauschbrand. *Centralb. Bakteriol.*, I. O. 56: 395-99.

SCOTT, J. P. — 1925 — Studies on certain characteristics of Clostridium chauvoei and Clostridium oedematis. *Journ. of Bacter.*, 10: 265-313.

SCOTT, J. P. — 1932 — Black-leg Immunization. *J. Amer. Veter. Med. Ass.*, 80: 848-862.

VILJOEN, P. R. e J. R. SCHEUBER — 1927 — Black-quarter in South Africa: With Special reference to Improved Methods of Inoculation. *11th and 12th Repts. Diretor Vet. Educ. a. Research*, Union of South Africa, p. 501-570.

WOLTERS, K. L. — 1930 — Über die Rauschbranderkrankungen der Schafe und ihre Bekämpfung durch Impfung mit Kulturfiltraten und Formolvaccinen. *Arch. Tierheilk.*, 61: 485-500.

ESTUDOS SÔBRE A "MANQUEIRA" DA CONSERVABILIDADE DE VACINAS

POR

C. Rodrigues

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Em publicação anterior foram apresentados os resultados de uma comparação entre o valor antigenico de filtrados de cultura formolados, de vacinas vivas atenuadas e de culturas mortas, formoladas, na indução, em cobaias, de imunidade ativa contra a manqueira.

Ficou então aparente, com base nos metodos e materiais empregados, que a imunidade conferida por culturas vivas, atenuadas, exatamente como a que advem do uso de culturas mortas, formoladas, é de nivel elevado.

Embora os filtrados de cultura tenham, tambem, nitida influencia imunizante, chegando em certos casos a provocar uma resistencia de solidez equiparavel á das vacinas totais, as manobras dispensaveis e trabalhosas implicadas em seu preparo os tornam menos satisfatorios para o emprego na profilaxia da manqueira.

Com o intuito de levar ainda mais adiante a comparação entre as qualidades inherentes, de um lado ás culturas atenuadas e de outro ás vacinas mortas que possam ser refletidas na conveniencia da escolha de uma destas técnicas, procuramos em seguida saber qual a deterioração do antigeno destas vacinas, quando submetidas a temperatura de nivel tropical e á ação do tempo.

As informações colhidas em literatura referem-se exclusivamente á influencia destas condições nas culturas mortas, nos filtrados e nas "agressinas". A julgar pelo que observaram VILJOEN e SCHEUBER, 1927, SCOTT, 1932, SCHMIEDHOFER, 1932, KONNO e HASHIMOTO, 1934 e SCHEUBER 1944, as culturas mortas manteem notavel estabilidade nas condições ambientes, permanecendo inalteravel a sua atividade durante um ano. Mantidas a 37°C, sua atividade é afetada. O filtrado de cultura é, aparentemente, um pouco menos estavel que a cultura formolada. Em relação á conservabilidade, parece mais resistente a "agressina natural", que, quando conservada em glycerina a 60 % e no frio, manteve-se intacta durante 30 meses, segundo VILJOEN e SCHEUBER; sem conservador e segundo SCOTT, durante 4 anos.

Faltam completamente informações sobre o comportamento de culturas vivas, atenuadas.

MATERIAL E METODOS

Tomamos para nosso estudo comparativo dois preparados, representativos de cada um dos tipos que nos interessaram:

I) — Mq 94, cultura total formolada, preparada em 6-X-1941 no Instituto Biologico, conforme processo detalhadamente exposto em recente publicação; conservada em geladeira desde seu preparo.

II) — Mq 90, cultura viva atenuada, obtida em 2-VII-1941, no Instituto Biologico, pela vegetação durante 12 dias do *Cl. chauvoei* 43, reativado, em caldo figado a 37° C. Esta cultura era, logo após a obtenção, apenas dotada de leve virulencia residual, tendo sido tolerada sem reação por duas cobaias, inoculadas na ocasião com 3 cc. Tambem foi transferida á geladeira, logo em seguida ao preparo.

Imediatamente depois de obtida, a vacina viva Mq 90 era capaz de proteger 18/18 cobaias contra uma dose de virus que matava 8/10 cobaias normais. Entretanto, nessa ocasião provocou dois acidentes de vacinação mortais, na dose de 1 cc, em cobaias.

Em condições semelhantes, a cultura morta Mq 94 protegeu, tambem na dose de 1 cc, 20/20 cobaias contra uma dose de virus capaz de matar 2/5 testemunhas.

Ulteriormente, essas duas vacinas foram distribuidas em empolas de 20 cc, depois de perfeitamente homogeneizadas. As empolas foram fechadas á lampada e conservadas a 4° C, no escuro.

Em data de 15-X-41, 12 empolas de cada vacina foram colocadas em uma estufa a 27° C.

Após o decurso de periodos regulares de 2 mezes, eram retiradas da estufa duas empolas de cada vacina, que voltavam a ser conservadas a 4° C, no escuro.

Desta forma, dispuzemos finalmente de amostras que haviam estado submetidas á temperatura de 27° C, durante 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses, e outras que não haviam abandonado o frigorifico.

Para as provas de proteção, empregamos sempre lotes de cobaias albinas, de peso semelhante, as quais recebiam 1 cc de vacina e, quatro semanas após, eram submetidas á prova de infeção pelo *Cl. chauvoei* 77, de origem europeia, não empregado na preparação das vacinas.

RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Para uma melhor análise da influencia do tempo e da temperatura no teor antigenico das vacinas, julgamos conveniente efetuar a prova em dois tempos, tomando para a primeira verificação vacinas conservadas 2, 4, e 6 meses nas condições designadas e analizando, numa segunda série, as consequencias de estadías mais prolongadas a 27° C, sejam 8, 10 e 12 meses.

Nesta segunda série, procedemos tambem á verificação da viabilidade da vacina 90. Dosamos ainda, comparativamente, duas

novas partidas de vacina morta, formolada, preparadas recentemente; a inclusão destas duas novas partidas obedeceu ao intuito de patentear uma possivel baixa do teor antigenico das partidas conservadas na geladeira por tão longo periodo.

TABELA 1

Conservabilidade de vacinas contra a manqueira, até o prazo maximo de seis meses. Comparação entre uma vacina do tipo morto, formolado, e outra do tipo vivo, atenuado.

Vacina	Tipo	Dosagem inicial	Permanencia a 4°C + 27°C		Prova de teor antigenico	
			4° C.	27° C	Inoculo	Resistem á DLM. 100%
Mq 90	Vivo	1cc protege	13 meses	—	1cc	20/20
		18/18 cobaias	11 "	2 meses	1cc	18/20
		contra	9 "	4 "	1cc	20/20
		1 DM 80%	7 "	6 "	1cc	20/20
Mq 94	Morto	1cc protege	10 meses	—	1cc	20/20
		20/20 cobaias	8 "	2 meses	1cc	20/20
		contra	6 "	4 "	1cc	19/19
		1 DM 40%	4 "	6 "	1cc	19/20

OBSERVAÇÃO — Virus de prova = ch. 77. 1DM. 100%=0,4cc mata 5/5 testemunhas. Tempo decorrido entre vacinação e prova de infeção = 30 dias.

TABELA 2

Conservabilidade de vacinas contra a manqueira até o prazo máximo de doze meses a 27°C. Comparação entre uma vacina do tipo morto, formolado, e outra do tipo vivo, atenuado.

Vacina	Tipo	Dosagem inicial	Permanencia a 4°C + 27°C		Prova de teor antigenico			Prova de vitalidade
			a 4°C	a 27°C	Inoculo (vacina)	Resistem a 0,5cc	0,8cc	
Mq 90	Vivo	1cc protege	18 meses	—	1 cc	3/8	5/8	Positiva
		18/18 cobaias	10 "	8 meses	1 cc	6/8	2/8	Negativa
		Contra 1 DM	8 "	10 "	1 cc	5/8	0/8	"
		80%	6 "	12 "	1 cc	7/8	3/8	"
Mq 94	Morto	1cc protege	15 meses	—	1 cc	8/8	7/8	—
		20/20 cobaias	7 "	8 meses	1 cc	8/8	6/8	—
		Contra 1 DM	5 "	10 "	1 cc	8/8	8/8	—
		40%	3 "	12 "	1 cc	8/8	8/8	—
Mq 106	Morto	—	7 meses	—	1 cc	8/8	8/8	—
Mq 107	Morto	—	5 meses	—	1 cc	8/8	5/8	—

OBSERVAÇÕES: — Virus de prova = ch. 77. 0,5 cc matam 3/5 testemunhas. Tempo decorrido entre a vacinação e a prova de infeção = 30 dias.

A primeira serie experimental, reproduzida na Tabela 1, nos demonstra que, de modo geral, tanto as vacinas mortas como as vivas não sofreram, com a permanencia a 27°C durante o periodo maximo de 6 mezes, uma baixa de antigenicidade que contra-indicasse seu uso prático, ou mesmo que fosse verificavel pelo metodo de prova utilizado.

Embora se tivesse lançado mão, para esta prova, de uma dose infectante relativamente elevada, não foi possivel demonstrar diferença apreciavel entre a potencia antigenica das vacinas continuamente conservadas em frigorifico e das submetidas por maior ou menor tempo á temperatura de prova. Tambem não ficou evidenciada nenhuma diferença de atividade entre a vacina morta e a atenuada.

Já a segunda serie, condensada na Tabela 2, apresenta algumas indicações diferentes.

Para esta serie experimental utilizamos duas doses de virus na prova de infeção, uma dose correspondendo aproximadamente á 50 % infectante, outra um pouco maior.

Deriva dos resultados a que chegamos que as culturas totais formoladas mantem seu efeito antigenico em nivel elevado, mesmo após a conservação por um ano a 27°C, e que existe grande probabilidade de não ser sua eficiencia afetada, de nenhuma maneira, pela conservação em frigorifico por periodo ainda mais prolongado.

A vacina de tipo atenuado utilizada nesta experiencia sofreu consideravel baixa de potencia antigenica, mesmo quando conservada sempre no frigorifico; o periodo da experiencia foi de 18 mezes.

Além disso, notou-se grande variabilidade no comportamento das cobaias vacinadas, o que nos deu a impressão de irregularidade da depressão antigenica sofrida, de empola para empola. Um fáto digno de nota é que mesmo as empolas guardadas permanentemente em frigorifico, a 4°C e no escuro, mostraram notavel baixa em sua capacidade vacinante, embora nelas permanecesse viavel o *Cl. chauvoei*.

Naturalmente, esta baixa do antigenismo da vacina atenuada Mq 90, pela simples manutenção no frio durante 18 mezes, veio perturbar a observação da influencia de exposições varias a 27°C; devemos ter em mente que todas as empolas utilizadas nesta serie foram analizadas 18 mezes após o preparo, variando apenas a duração da exposição a 27°C. Nem ao menos é justificavel a admissão de um aceleramento da deterioração, pela permanencia mais ou menos prolongada sob temperatura tropical. Valida é, entretanto, a afir-

mativa de não exercer esta uma influencia mais favoravel que a das temperaturas baixas.

Outro fato digno de nota é a perda de vitalidade dos germens, na vacina viva mantida a 27°C mais de 6 mezes, embora não seja esta, evidentemente, a causa fundamental da baixa de antigenicidade.

DISCUSSÃO

A conservabilidade de vacinas contra a manqueira em condições ambientes já havia sido verificada por SCHEUBER, 1944, estudando uma vacina muito semelhante á aqui analizada, de tipo total morto, formolado. Nossos resultados, a este respeito, quase se superpõem aos seus.

Parece-nos que as verificações relacionadas com vacina viva, cultura atenuada, foram agora efetuadas pela primeira vez.

Os resultados observados com estas culturas atenuadas não são facilmente interpretaveis. A hipotese de perda de antigenismo ligada á desvitalização, já contraditada pelo poderoso efeito de vacinas originariamente mortas, ainda é posta em cheque pelo fato de vacinas atenuadas, conservadas longo tempo em frigorifico, perderem sua atividade em grau comparavel ao das mantidas temporariamente a 27° C, embora continuem viaveis os germens que contênham.

É possivel que, nas culturas atenuadas, em constante atividade, embora muito reduzida pela manutenção em baixa temperatura e por saturação do meio ambiente, se estabeleçam finalmente condições impróprias á manutenção do antigeno, embora ainda, durante certo tempo e sob dadas condições, incapazes de promover a desvitalização das bacterias.

Lamentavelmente, não nos ocorreu efetuar, nas empolas conservadas a 27° C menos de 8 mezes, a prova de viabilidade; em virtude disso, todos os casos observados de esterilidade correspondem a baixa de teor antigenico, embora a reciproca não acontecesse.

Entretanto, o que fica indicado pelos dados experimentais por nós obtidos, com o material usado e as condições em que trabalhamos, é a possibilidade de perda do valor antigenico, em prazo relativamente curto e mesmo a 4°C, por vacinas vivas de tipo atenuado, sem que a prova de vitalidade possa servir de indice para esta perda.

Outro fáto que merece consideração é a possivel heterogeneidade do conteúdo de diferentes empolas de uma mesma partida de vacina viva, distribuida ainda no curso de uma atividade cuja evolução ulterior foge a qualquer previsão.

Não se deve, obrigatoriamente, aplicar as conclusões fornecidas por esta experiencia a todas as modalidades de vacina do tipo atenuado existentes. Já tivemos oportunidade de frizar, em publicação anterior, que a vacina atenuada Mq 90, difere em alguns pontos de outras vacinas do mesmo tipo, que pudemos analizar. Mas existe uma probabilidade bastante acentuada, de serem os fenomenos aqui examinados verificaveis tambem em outras variantes deste tipo de vacina; experiencias neste sentido seriam, sem duvida, aconselhaveis.

RESUMO

Em prosseguimento de estudos tendentes a determinar o valor relativo dos diversos antigenos, hoje empregados para a proteção de bovinos contra a infecção causada pelo *Cl. chauvoei*, foi efetuada uma comparação entre a resistencia de vacinas totais formoladas e de vacinas vivas atenuadas, á ação do tempo e a temperatura de nivel tropical.

Estas experiencias consistiram na medida da capacidade vacinante de diferentes empolas dos dois antigenos acima citados, apóz o decurso de periodos variaveis, entre o preparo e a prova. Durante este intervalo, algumas empolas foram conservadas continuamente a 4° C, no escuro; outras sofreram, temporariamente, a influencia da temperatura de 27° C, em estufa, no escuro, sendo depois novamente transferidas para o frigorifico, a 4° C.

Numa primeira série de experiencias, foram provadas empolas tanto do antigeno vivo como do antigeno morto, apóz as seguintes permanencias somadas, a 4° C — 27° C.:

Antigeno vivo	Antigeno morto
a) 13 meses a 4°C	a) 10 meses a 4°C
b) 11 meses a 4°C + 2 meses a 27°C	b) 8 meses a 4°C + 2 meses a 27°C
c) 9 meses a 4°C + 4 meses a 27°C	c) 6 meses a 4°C + 4 meses a 27°C
d) 7 meses a 4°C + 6 meses a 27°C	d) 4 meses a 4°C + 6 meses a 27°C

Cada uma das empolas foi provada pela inoculação de lcc em lotes de 20 cobaias, com ulterior prová de infecção por meio de dose certamente letal de virus "*chauvoei*".

Os resultados desta primeira serie de experiencias demonstraram que tanto as vacinas vivas, atenuadas, como as vacinas mortas, formoladas, não sofreram perda de poder antigenico apóz, respectivamente, 13 mezes e 10 mezes do preparo, fossem elas conservadas continuamente a 4° C e no escuro, fossem submetidas á influencia intercurrente de 6 mezes de exposição a 27° C.

Numa segunda serie de experiencias, foram provadas empolas dos dois antigenos estudados, apóz as seguintes permanencias somadas, a 4° C — 27° C.:

Antigeno vivo	Antigeno morto
a) 18 meses a 4°C	a) 15 meses a 4°C
b) 10 meses a 4°C + 8 meses a 27°C	b) 7 meses a 4°C + 8 meses a 27°C
c) 8 meses a 4°C + 10 meses a 27°C	c) 5 meses a 4°C + 10 meses a 27°C
d) 6 meses a 4C + 12 meses a 27°C	d) 3 meses a 4°C + 12 meses a 27°C

Cada uma das empolas foi agora provada pela inoculação de lcc em lotes de 16 cobaias; a prova de infecção ulterior foi efetuada com duas doses diferentes de virus "*chauvoei*", recebendo a metade de cada lote uma dose capaz de matar 3/5 das cobaias normais inoculadas, e a outra metade uma dose capaz de matar 8/8 cobaias normais.

Os resultados desta segunda serie deixaram demonstrado que a vacina morta utilizada não sofreu perda evidente de poder antigenico 15 mezes apóz o preparo, mesmo quando conservada a maior parte deste tempo, ou sejam 12 mezes, a 27° C.

A vacina viva analisada tinha sua atividade muito diminuida 18 mezes apóz o preparo, mesmo quando conservada continuamente a 4° C. Foi ainda verificado que esta vacina viva perdia sua vitalidade, quando mantida 8 mezes a 27° C + 10 mezes a 4° C, mas não a perdia quando mantida continuamente a 4° C. Não ha, pois, relação entre a perda de vitalidade e o enfraquecimento antigenico.

As vacinas utilizadas nesta verificação foram as seguintes:

a) Cultura viva, atenuada pela exposição a 37° C durante 12 dias.

b) Cultura total, formolada, esteril.

CONCLUSÕES

1) — Uma vacina contra a manqueira do tipo cultura total morta, formolada, não sofreu perda aparente de teor antigenico apóz permanecer 12 mezes a 27° C ou 15 mezes a 4° C.

2) — Uma vacina contra a manqueira, do tipo cultura viva, atenuada, não sofreu apreciavel queda de poder antigenico pela permanencia de 13 mezes a 4° C ou pela permanencia de 6 mezes a 27° C e 7 mezes a 4° C. Entretanto, 18 mezes apóz a fabricação, esta vacina apresentou pronunciada queda de potencia antigenica, mesmo quando conservada continuamente a 4° C.

Deixamos aqui consignados nossos agradecimentos a L. G. VASCONCELOS, pela sua ajuda técnica; ao Dr. VITOR CARNEIRO, que gentilmente reviu os originais; ao Snr. R. L. ARAUJO, por seu auxilio na redação do resumo em inglês.

STUDIES ON BLACK-LEG: — ON THE KEEPING QUALITIES OF VACCINES

Abstract

In another paper the results of a comparison of the antigenic activity of three different types of black-leg vaccines were presented, in an atempt at ascertaining the relative merits of each.

As an extension of those studies, the capacity of the formolized whole culture and the attenuated culture to withstand the effects of prolonged influence of tropical temperature conditions, as well as ageing, are now considered. Culture-filtrates were not included, because they have previously proved to be less satisfactory, as to their antigenic activity; and also because of the inconveniences involved by their preparation, which to a certain extent handicaps their use.

The experiments here described were distributed in two sets. In the first one, there was studied the influence of successive periods of maintenance at 4° C and 27° C, on isolated vials of the same batches of the two vaccines analized. The maximum period considered was 13 months; the following scheme having been adopted for the test:

Attenuated culture

1st vial: 13 months at 4°C
2nd vial: 11 months at 4°C & 2 mths at 27°C
3d vial: 9 months at 4°C & 4 mths at 27°C
4th vial: 7 months at 4°C & 6 mths at 27°C

Formolized whole culture

5th vial: 10 months at 4°C
6th vial: 8 months at 4°C & 2 mths at 27°C
7th vial: 6 months at 4°C & 4 mths at 27°C
8th vial: 4 months at 4°C & 6 mths at 27°C

The antigenic activity of each of the 8 vials was determined by the inoculation of 1 cc in lots of 20 guinea-pigs, and the resistance induced in these animals was afterwards tested against one dosis certe lethalis of Cl. chauvoei.

As a result of this set of experiments, it was evidenced that both of the vaccines tested withstood the conditions to which they had been submitted, without any apparent loss of antigenic activity.

In a second set of experiments, the maximum period of exposition was extended to 18 months, all conditions alike. It was carried on in accordance to the following scheme:

Attenuated culture

1st vial: 18 months at 4°C
2nd vial: 10 months at 4°C & 8 mths at 27°C
3d vial: 8 months at 4°C & 10 mths at 27°C
4th vial: 6 months at 4°C & 12 mths at 27°C

Formolized whole culture

5th vial: 15 months at 4°C
6th vial: 7 months at 4°C & 8 mths at 27°C
7th vial: 5 months at 4°C & 10 mths at 27°C
8th vial: 3 months at 4°C & 12 mths at 27°C

The antigenic activity of the vaccines was now tested by the inoculation of 1 cc in lots of 16 guinea-pigs; each lot was subsequently submitted to the infection by a highly virulent culture of Cl. chauvoei, so that one half of each lot received a cultural dosis which proved to be lethal for 3/5 of the normal guinea-pigs inoculated, and the other half received a stronger dosis.

The results of this second set of experiments demonstrated that the formolized whole culture was apparently unimpaired by the permanence at 4° C for 15 months and by the permanence at 27° C for 12 months and at 4° C for 3 months.

The stock of vials from which were taken the samples of the attenuated type of vaccine was maintained at 4° C for 18 months and showed strong loss of activity, although retaining its viability. Vials from the same stock when kept at 27° C for 8 months and at 4° C for 7 months, besides loosing their viability also showed loss of activity.

BIBLIOGRAFIA

KONNO, T. e K. HASHIMOTO — 1934 — Ueber die Bedeutung von formolisierten Rauschbrandkulturen zur Schutzimpfung. *J. Jap. Soc. Veter. Science*, 13: 19-38. Resumo em *Centr. Bakter.*, Ref., 118: 499 (1935).

RODRIGUES, C. — 1945 — Estudos sôbre a manqueira: — Do preparo e controle da vacina formolada. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 16: 217-242.

RODRIGUES, C. — 1945 — Estudos sôbre a manqueira: — Do valor antigenico de três tipos de vacina. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 16: 243-254.

SCHEUBER, J. R. — 1944 — Some Remarks on Black Quarter Vaccins. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind.*, **19**: 17-22.

SCHMIEDHOFER — 1932 — Schutzimpfung gegen Rauschbrand mit Formol-Vakzine nach Leclainche u. Vallée. *Deut. Tierärztl. Wochens.*, p. 545-547.

SCOTT, J. P. — 1932 — Black-leg immunization. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, **80**: 848-862.

VILJOEN, P. R. e J. R. SCHEUBER — 1927 — Black-Quarter in South-Africa: With Special Reference to Improved Methods of Inoculation. *11th and 12th Repts. Director Vet. Educ. a. Res.*, Union of South Africa, p. 501-570.

———o———

ESTUDOS SÔBRE A "MANQUEIRA"
DETERMINAÇÃO DA POTENCIA ANTIGENICA DE VACINAS CONTRA "CLOSTRIDIUM CHAUVOEI"

POR

C. Rodrigues

Do Instituto Biologico de S. Paulo

SUMÁRIO

Introdução
Condições tecnicas para dosagem dos antigenos "chauvoei"
Escolha do animal de prova
Condicionamento da cobaia
Condicionamento do virus infectante
Escolha da dose conveniente para a prova de infecção
Determinação da dose letal 50% do virus "chauvoei"
Sensibilidade do metodo de dosagem proposto
Resumo
Conclusões
Bibliografia

A avaliação da potencia dos preparados empregados na imunização contra o *Clostridium chauvoei*, da maior importancia para a evolução e o aperfeiçoamento dos estudos sôbre este antigeno, é uma questão que ainda não encontrou solução pratica.

Aparte esforços parciais e inconsequentes de quase todos os autores que se preocuparam com os antigenos "chauvoei" e a imunidade por eles conferida, podemos distinguir tres tentativas organizadas e sistematicas para a resolução deste problema: uma levada a efeito por GOSS e SCOTT, em 1918, outra por SCOTT, em 1923, e outra por MASON, em 1936.

GOSS e SCOTT estudaram e propuzeram um método indireto de dosagem, chamado "test de neutralização", para o qual se basearam na capacidade das agressinas naturais ou filtrados, de neutralizar os anticorpos do soro imune, ou mesmo os presentes no soro normal de cavalo. O indice dessa neutralização era fornecido pela inoculação simultanea de dose mortal de virus. Desta forma, os citados autores poderiam determinar o numero de unidades "agressinicas" do filtrado empregado, isto é, o numero de porções de antigeno equivalentes ao existente numa dose letal minima de virus, e contidos na unidade de volume de filtrado.

O metodo de GOSS e SCOTT nunca foi largamente experimentado. MASON, em 1936, não conseguiu obter resultados comparaveis e regulares, pelo emprego deste metodo; tambem DACORSO, numa tentativa de confirmação efetuada em 1940, obteve resultados negativos.

O novo metodo apresentado por SCOTT em 1923, e por ele denominado da "cultura lavada", tinha como bases: a) o fato de culturas virulentas de *Clostridium chauvoei* perderem completamente sua virulencia quando libertadas de seus produtos de metabolismo soluveis por sucessivas lavagens em solução salina; b) a capacidade dos filtrados e agressinas "chauvoei" de ativar doses minimas dessas culturas lavadas, avirulentas, de forma a lhes restituir a virulencia primitiva.

O metodo, que determinava a menor dose de filtrado ou agressina capaz de promover a recuperação da virulencia dessas culturas, não teve repercussão, possivelmente porque só seria aplicavel á dosagem de filtrados ou agressinas naturais, não se adatando ao uso de vacinas totais e, menos ainda, ao de vacinas vivas, do tipo atenuado. Ora, é bem sabido hoje, depois de elegante demonstração de HENDERSON, que a imunidade contra a manqueira é provocada, em grande parte senão em sua totalidade, pelo antigeno somatico termoestavel, preso aos corpos bacterianos. O confronto entre os metodos de neutralização, de GOSS e SCOTT, e da "cultura lavada" de SCOTT, não deu a este ultimo autor resultados concordantes.

Levado por seu sucesso na verificação da existencia de uma toxina soluvel do *Clostridium chauvoei*, MASON tentou em 1936 estabelecer um metodo de dosagem, baseado na presença de antitoxina no soro de animais vacinados, fossem eles cobaias ou carneiros. Chegou, naturalmente, a resultados desfavoraveis, demonstrando, ao contrario, que a antitoxina não exerce papel na imunidade contra a manqueira.

CONDIÇÕES PARA O ESTABELECIMENTO DE UM MÉTODO DE DOSAGEM DOS ANTIGENOS "CHAUVOEI"

Do que se tem feito e é hoje sabido, em relação á imunidade contra a manqueira e aos processos de avalia-la, chega-se á conclusão de que o unico acesso a esta avaliação será dado pela prova direta da imunidade, induzida em animais sensiveis, previamente vacinados.

As condições para a exequibilidade desta prova podem ser assim definidas:

a) Existencia de animais sucetiveis, de facil obtenção, trato e manejo, que, pela combinação do numero de animais em prova e pequena variação individual de sensibilidade, permitam a obtenção de resultados comparaveis.

b) Possibilidade de manter inalteravel, ou com ritmo de alteração lento e conhecido, um virus para prova de infecção, preferivelmente um virus-cultura.

c) Proporcionalidade entre a quantidade de antigeno injetada e a resistencia media adquirida.

A estas condições se deve ainda acrecentar, no intuito de ser estabelecido um padrão universal, a possibilidade de ser obtido um antigeno padrão, completo e inalteravel.

O presente trabalho teve por fundamento a procura de meios capazes de contornar ou remover os obstaculos até agora encontrados, nas tentativas de estabelecimento de uma tecnica segura de dosagem dos antigenos *chauvoei*. Propuzemo-nos estudar, particularmente:

1) Condicionamento da cobaia, como animal de prova.

2) Estabilização das culturas utilizadas na prova de infeção.

Como se verá, acreditamos poder trazer a estes dois objetivos uma solução pratica satisfatoria.

ESCOLHA DO ANIMAL DE PROVA

Como se evidencia da experiencia geral, o preenchimento da questão representada pela escolha do animal a ser empregado nas provas, não tem podido ser executado de forma inteiramente satisfatoria.

Todas as especies de animais sucetiveis á manqueira apresentam exageradas variações de sensibilidade individual. Das usualmente empregadas em laboratorio, apenas a cobaia preenche a condição de ser sensivel; entretanto, encontram-se normalmente tamanhas variações individuais nessa sensibilidade, que a opinião generalizada é ser esse animal improprio para provas de dosagem.

O coelho e o rato são insuscetíveis. O camondongo, apenas á custa de adjuvantes pode ser tornado receptivo.

Os unicos outros animais sensiveis á manqueira, o bezerro e o carneiro, não podem, de forma alguma, ser incluidos entre os utilizaveis para provas de laboratorio. Aliás, mesmo que fossem mais manejaveis, pairam fortes duvidas quanto à homogeneidade de sua reação. O bezerro tem sido acusado, frequentemente, de apresentar

largas diferenças de sensibilidade, e é bem sabido que com a idade esse animal se torna naturalmente resistente. Quanto ao carneiro, unicamente na Africa do Sul usado com frequencia e constancia para provas de laboratorio, basta analizar os protocolos das publicações de SCHEUBER, MASON e SCHEUBER, e MASON, para se ter ideia da irregularidade de comportamento desse animal, sobre o que insiste BRAGA em recente publicação (1943).

Torna-se pois evidente que nenhum animal existe que, em condições naturais, reuna as qualidades ideais para o estabelecimento de uma técnica de dosagem digna de fé. Dispomos entretanto de tres animais sensiveis, alem de um sensibilizavel, a saber: a cobaia, o carneiro, o bezerro e o camondongo. E dispomos tambem de dois meios eficientes para anular as diferenças individuais, quais sejam a seleção genetica e o uso de grupos consideraveis para as inoculações de prova.

Ambos teem sido utilizados largamente, e a conveniencia e vantagem de seu emprego repetidamente demonstrados. Por fugir ao escopo deste trabalho, não nos deteremos em sua analise, referindo ao leitor a excelente publicação de PRIGGE, 1939, sobre o antigeno difterico, onde serão encontrados detalhes e bibliografia a respeito.

E' claro que si pudermos lançar mão, simultaneamente, desses dois metodos de apuramento, melhor e mais depressa chegaremos a resultados favoraveis.

Baseados na sensibilidade natural da cobaia e em outras conveniencias facilmente compreensiveis, escolhemos este animal para nossa tentativa de determinação de um reator apropriado.

CONDICIONAMENTO DA COBAIA COMO ANIMAL DE PROVA

De ha muito vem o Instituto Biologico de São Paulo procurando estabelecer uma linhagem de cobaias relativamente pura. Esta preocupação surgiu, a principio, do intuito de eliminar das criações as cobaias de pelo arrepiado, que pelas nossas verificações estão entre as raças especialmente resistentes, tanto ao envenenamento pela toxina tetanica como á infecção pelo *Clostridium chauvoei*.

Posteriormente, nosso interesse evoluiu no sentido de se obter, ao lado disso, uma familia relativamente pura do ponto de vista genetico. De forma que passamos, da eliminação dos reprodutores de pelo arrepiado, á seleção de outros de tipo homogeneo. Os caracteres tomados como base para essa seleção foram entretanto meramente fisicos e externos, e se apoiaram na pigmentação. Foi assim

criado, como "*standard*" de nossos bioterios, o tipo de cobaia albino, de pelagem homogeneamente branca, lisa, e tegumentos expostos incolores. Embora com isso estejamos ainda longe de ter obtido uniformidade do ponto de vista genetico, já dispomos de material razoavelmente homogeneo, quando tomado em grupos substanciais.

Nossas verificações quanto à variação da sensibilidade á infecção pelo *Clostridium chauvoei*, deste material animal até certo ponto uniforme, indicam ser possivel, tomando como unidade de medida o comportamento de grupos de cinco cobaias, obter resultados em certa medida comparaveis, grosseiramente relacionados com a quantidade de virus-cultura inoculada. Foi assim possivel estabelecer doses aproximadamente 100% mortais, ou aproximadamente 50% mortais, isto é, matando com maior frequencia todas as cinco, ou duas, ou tres das cobaias inoculadas. Já DACORSO, em 1940, em tese preparada em nosso laboratorio, dá disso uma demonstração pratica.

A experiencia por nós acumulada nos ultimos quatro anos só vem confirmar os resultados por este autor apresentados. Os dados obtidos desde aquela epoca deixam bem claro que, nessas condições e com o material de que dispomos, a reação das cobaias inoculadas apresenta suficiente homogeneidade e decorre suficientemente relacionada com o volume de virus inoculado.

Os protocolos expostos nas tabelas 1 e 2 deste trabalho deixam suficiente demonstração disso. Exprimem o intuito de determinar si cobaias inoculadas com quantidades variaveis de virus-cultura apresentam reações e mortes proporcionais ao volume inoculado, e si, levando em consideração o enfraquecimento gradual do virus, as reações de cobaias inoculadas em diferentes periodos se mostravam comparaveis.

Do exame dessas tabelas pode-se verificar que estas duas condições ficam preenchidas pelo uso de grupos de cinco cobaias, da raça de que dispomos, para cada prova.

Ainda a respeito das tabelas 1 e 2 é conveniente frizar que as condições experimentais foram sempre mantidas na maior uniformidade exequivel. Alem das precauções relacionadas com o virus da prova de infecção, que em seu devido lugar serão descritas, tomavamos cobaias de peso semelhante, conservando-as, nas diversas series, em condições ambientes semelhantes. Entretanto, nenhum cuidado especial pôde ser tomado para contrabalançar as diferenças de temperatura e humidade nos diversos periodos de trabalho; nem uma possivel variação estacional de sensibilidade foi considerada.

TABELA 1

Dosagem, em diversas epocas, do virus-cultura A77 (1211)
(Reativado em 23-9-41, 1 passagem)

Data da Dosagem	Doses de Cultura	Numero de Cobaias	Resultado das inoculações					Sobrevivem
			Mortas apóz					
			24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	> 96 hr	
17-10-41	0,3cc	5	1	1	2	—	1	—
	0,4cc	5	—	3	2	—	—	—
	0,5cc	5	—	3	—	—	2	—
4-11-41	0,5cc	5	—	2	2	—	—	1
	0,7cc	5	3	2	—	—	—	—
7-1-42	0,6cc	5	3	—	—	—	2	—
	0,8cc	5	4	1	—	—	—	—
	1,0cc	5	5	—	—	—	—	—
26-2-42	0,4cc	5	—	—	—	1	—	4
	0,6cc	5	1	1	—	—	—	3
3-3-42	0,4cc	5	1	2	—	—	—	2
	0,6cc	5	1	1	1	—	—	2
	0,8cc	5	3	1	—	—	—	1

TABELA 2

Dosagem, em diversas epocas, do virus-cultura A77 (1590)
(Reativado em 19-2-42, 2 passagens successivas)

Data da Dosagem	Doses de Cultura	Numero de Cobaias	Resultado das inoculações					Sobrevivem
			Mortas apóz					
			24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	> 96 hr	
2-11-42	0,3cc	5	2	2	—	—	—	1
	0,5cc	5	4	—	—	1	—	—
	0,7cc	5	5	—	—	—	—	—
2-2-43	0,3cc	5	3	1	—	—	—	1
	0,5cc	5	4	—	1	—	—	—
	0,7cc	5	5	—	—	—	—	—
2-3-43	0,3cc	5	—	2	1	—	—	2
	0,5cc	5	1	4	—	—	—	—
	0,7cc	5	4	1	—	—	—	—
27-5-43	0,3cc	5	2	1	—	—	—	2
	0,5cc	5	4	1	—	—	—	—
	0,7cc	5	1	4	—	—	—	—

Como consequencia das observações efetuadas, num dilatado periodo, tornou-se pois evidente que, tomadas certas precauções e num sentido relativo, as cobaias com que trabalhamos reagem á inoculação de virus da manqueira de forma regular e proporcional.

CONDICIONAMENTO DO VIRUS PARA PROVA DE INFECÇÃO

Cultivado em condições normais, o *Clostridium chauvoei* tende a perder a virulencia com extrema facilidade. O fenomeno é de tal ordem que, mesmo partindo de amostras bastante virulentas, culturas conservadas mais de 48 horas a 37°C dificilmente são capazes de infectar o animal de experiencia, quando inoculadas em doses normais. E' claro que, em tais condições, é impossivel prever o efeito que certa dose de cultura terá sobre um animal sensivel, mesmo que provas recentes tenham determinado previamente sua ocasional virulencia.

O desconhecimento da capacidade patogenica do virus utilizado em verificações de imunidade tem ainda maior significação que a irregularidade de reação dos animais em prova, pois esta pode ser corrigida pelo uso de grupos numerosos e tratamento estatistico dos resultados, ao passo que para aquela não existe remedio eficaz, sendo o experimentador obrigado a confiar exclusivamente nas circunstancias fornecidas pelo acaso.

Para o estabelecimento de um processo aceitavel de avaliação de imunidade, torna-se portanto essencial e obrigatorio contar com um virus para prova de infecção, cuja atividade seja previsivel, embora a curto prazo.

Já numerosos autores se teem preocupado com este problema. NITTA, 1918, estabilizava o virus empregado por meio de glicerina; suas culturas glicerinadas mantinham a virulencia durante 10 mezes. SCOTT, 1926, usava para as culturas substrátos contendo sais ferricos, cuja presença se mostrou favoravel á exaltação da virulencia. HENDERSON, 1932, tentou obter estabilização utilizando esporos lavados que, para a inoculação, ativava com cloreto de calcio; sua tecnica resultou entretanto pouco util, nas mãos de MASON e SCHEUBER, 1936. Tambem BRAGA, 1942, 1943, chama a atenção para os cuidados necessarios á estabilização do virus para prova de imunidade.

Nossas tentativas neste sentido dirigiram-se inicialmente á obtenção de um virus suficientemente ativo. Com este intuito, e seguindo uma regra geralmente adotada, experimentamos com exito fazer

passagens sucessivas em cobaia, com hemocultura em Tarozzi, realizada por semeadura praticada na faze agonica. Desta forma tornou-se possivel a obtenção normal de culturas ativas em doses de 0,2cc a 0,3cc, após duas a tres passagens em cobaia.

Tomando depois como matrizes estas hemoculturas, conservadas no frigorifico a 4°-6°C assim que francamente vegetadas, pudemos então verificar que a atividade patogenica de subculturas destas matrizes se mantinha no mesmo nivel, desde que elas fossem sempre primarias e que nos rodeassemos das precauções necessarias para que as circunstancias ambientes se mantivessem constantes.

Em detalhe, a obtenção, a manutenção e o emprego do virus-cultura ficaram regulados pela seguinte metodologia:

a) — Reativação: — Inoculação de cobaias com dose suficiente de culturas de *Clostridium chauvoei*, ativas naturalmente, ou ativadas pela junção de saponina a 1%. Sangria destas cobaias, quando em faze adiantada da doença, por punção direta do coração. A hemocultura se fará em caldo conforme Tarozzi, com pedaços de figado, sob vaselina. Eventualmente o processo é repetido até a obtenção de hemoculturas fortemente ativas; em regra, uma ou duas passagens em cobaia são suficientes para se atingir a exaltação desejada.

b) — Manutenção: — Apóz a vegetação, a 37°C durante 18-24 horas, a hemocultura é recolhida em frigorifico, sendo deste então mantida continuamente a 4°-6°C. Verificada sua pureza, pelo exame das colonias nacidas em placas de agar-sangue sob anaerobiose, pela ausencia de vegetação em agar inclinado em aerobiose, e pelo exame microscopico de preparações coradas, esta hemocultura passa a ser considerada matriz de virus-cultura.

c) — Emprego: — No momento do uso, faz-se da matriz um repique para grandes tubos neutros, contendo uma quantidade constante de caldo conforme Tarozzi, a pH 7,6—7,8 sob vaselina, e contendo um pedação de figado envolto em celofane. Para garantir uniformidade do substrato, estes tubos são preparados em partidas de 20 a 30, e cada tubo contem 150cc de meio. São conservados em frigorifico, e regenerados por aquecimento, logo antes do uso. Para as semeaduras, procura-se partir sempre de quantidade constante de cultura matriz, aproximadamente 0,5cc. Esta subcultura primaria é mantida a 37°C pelo espaço de 15-22 horas; deve, ao ser retirada, apresentar ainda turvação franca, pois a grumação e deposição das celulas que se observa em cerca de 24 horas de cultura corresponde a uma baixa de atividade patogenica, alem de prejudicar a homogeneidade da emulsão.

Para as inoculações, esta cultura é transvasada para tubos de capacidade aproximada de 200cc, apresentando em sua parte inferior uma pequena abertura lateral com colo de 1 centimetro, fechada por meio de membrana de borracha. Estes tubos ficam protegidos da luz por um envoltorio de papel negro, e a cultura neles contida é isolada do ar por meio de uma camada de vaselina. As porções a serem inoculadas são sucessivamente retiradas através a membrana de borracha, pela abertura inferior. Desta forma se consegue manter em idêntica condição o inoculo recebido pelo primeiro e ultimo animais, mesmo quando estes são muito numerosos.

Procedendo da forma e com os cuidados acima descritos, é possivel obter culturas de *Clostridium chauvoei* suficientemente ativas e estaveis para serem empregadas no sentido de um efeito previsto e desejado, como é a inoculação de prova de infeção. Considerando a inevitavel existencia de variações de sensibilidade nos animais provados, os resultados obtidos pela inoculação destas culturas em grupos de cinco cobaias mostraram-se sempre normalmente correlacionados, como pode ser deduzido das verificações reunidas na tabela 3.

TABELA 3

Dosagem, em diversas epocas, do virus A77 (1590), reativado em 19-2-42. A coluna final indica o tempo decorrido entre o preparo desta matriz e a dosagem indicada

Data da verificação	Doses de cultura	Numero de cobaias	Resultado das inoculações						Idade da matriz
			Mortas apóz					Vivem	
			24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	> 96 hr		
2-12-42	0,3cc	5	2	2	—	—	—	1	286 dias
2- 2-43	0,3cc	5	3	1	—	—	—	1	348 "
2- 3-43	0,3cc	5	—	2	1	—	—	2	376 "
27- 5-43	0,3cc	5	2	1	—	—	—	2	462 "
2-12-42	0,5cc	5	4	—	—	1	—	—	286 dias
10-12-42	0,5cc	5	1	3	—	—	—	1	294 "
2- 2-43	0,5cc	5	4	—	1	—	—	—	348 "
9- 2-43	0,5cc	5	1	2	—	—	—	2	355 "
2- 3-43	0,5cc	5	1	4	—	—	—	—	376 "
5- 3-43	0,5cc	5	—	4	—	—	—	1	379 "
27- 5-43	0,5cc	5	4	1	—	—	—	—	462 "
29- 5-43	0,5cc	5	2	2	1	—	—	—	464 "
12- 8-43	0,5cc	5	2	1	—	—	—	2	539 "
2-12-42	0,7cc	5	5	—	—	—	—	—	286 dias
2- 2-42	0,7cc	5	5	—	—	—	—	—	348 "
2- 3-43	0,7cc	5	4	1	—	—	—	—	376 "
27- 5-43	0,7cc	5	1	4	—	—	—	—	462 "
22-12-43	0,7cc	5	5	—	—	—	—	—	671 "
8- 3-44	0,7cc	5	5	—	—	—	—	—	748 "

Na analise desta tabela, devem chamar a atenção discrepancias acentuadas entre provas efetuadas em epocas sempre muito proximas, nas quais se usou a quantidade de 0,5cc como dose de cultura. Assim nas dosagens efetuadas em 2 e 10 de dezembro de 1942, 2 e 9 de fevereiro de 1943, 2 e 5 de março de 1943. Cabe aqui anotar que estas anomalias foram ulteriormente corrigidas pelo uso integral das re-

comendações descritas acima, quando se tratou do emprego de virus-cultura. Elas se relacionavam ao seguinte fato: as dosagens inscritas sob as datas mais precoces representam dosagens previas, destinadas a acertar a infecciosidade do virus, para a ocasião. As culturas eram feitas em tubos contendo pequena quantidade de meio, e as inoculações se efetuavam rapidamente, pois o numero de animais a inocular era sempre pequeno. As dosagens inscritas sob as datas mais tardias se referem a testemunhas de dosagem de vacina, quando as culturas eram feitas em tubos contendo grande quantidade de meio, não se tomavam precauções especiais para proteção do virus, durante a fase de inoculação, e as cobaias testemunha eram sempre injetadas depois de uma longa serie de cobaias vacinadas, isto é, depois de longa exposição do virus. Com as precauções ulteriormente postas em pratica, estas discrepancias puderam ser extintas, como já se pode verificar nas dosagens de 27 e 29 de maio de 1943.

Dada a simplicidade de obtenção do virus-cultura pelo processo acima indicado, não foram feitas tentativas para obter virus seco, seja sob a forma de culturas artificiais dessecadas, seja sob a de material obtido naturalmente e tambem dessecado, dado que, em ambos os casos, o preparo seria muito mais trabalhoso, de dificil asepsia e remota probabilidade de resultados mais vantajosos.

Entretanto é conveniente salientar que nem todos os virus-cultura apresentam uma patogenicidade estavel e regular. Nos desvios aparenta consideravel influencia o substrato utilizado, seja para a obtenção da cultura matriz, seja para o repique que antecede a inoculação. Partidas preparadas em diferentes ocasiões, embora pelo mesmo individuo e seguindo o mesmo metodo, podem fornecer resultados desajustados. O estadio da vegetação tambem tem uma influencia decisiva, como se verá ulteriormente.

Tambem em relação á amostra do *Clostridium chauvoei* utilizada, pode-se verificar maior ou menor tendencia á queda e final perda de capacidade patogenica. A amostra 77, originariamente obtida de Henderson, é uma das mais estaveis que possuimos. Partindo dela, dificilmente um virus-cultura se inutiliza antes de decorridos seis mezes.

Em qualquer caso, torna-se estrictamente necessario acompanhar de perto a gradual perda de atividade do virus, por constantes redosagens, e usar um numero determinado de testemunhas em cada prova. Tambem deve ser evitado o uso de culturas de atividade fraca, necessitando mais de 0,7cc para matar a cobaia normal de 350-400 gramas de peso.

Pode-se entretanto concluir das verificações efetuadas que, seguindo-se estritamente as precauções indicadas, é possivel obter e conservar uma cultura de *Clostridium chauvoei* que, pela relativa estabilidade de sua capacidade patogenica e pela regularidade de ação, mereça confiança como elemento de prova de infeção de animais sensiveis, previamente imunizados.

ESCOLHA DA DOSE MAIS CONVENIENTE DE VIRUS PARA PROVA DE INFECÇÃO

Dispondo portanto de animais de sensibilidade suficientemente regular, e de um elemento de prova tambem suficientemente regular e ativo, o problema da dosagem de antigenos contra a manqueira encontra solução teorica, dado que a inoculação destes antigenos em animais sensiveis é capaz, por definição, de diminuir sua sensibilidade.

As questões praticas a serem resolvidas, antes que tal processo pudesse entrar em faze de execução, podem ser assim enunciadas: sensibilidade do metodo, isto é, capacidade de evidenciar as variações de receptividade condicionadas por pequenas diferenças de volume do antigeno inoculado; proporcionalidade entre a quantidade de antigeno inoculado, e o efeito da inoculação de virus, na prova de infecção.

A primeira questão está estreitamente ligada á escolha da dose ou das doses de virus a serem empregadas na prova de infecção.

Numa determinação de potencia antigenica, o papel desempenhado pela inoculação de virus, embora muito importante, deve ser necessariamente secundario, no sentido de poderem existir em cada prova pequenas variações no efeito da dose empregada. Admitindo-se como premissa a regularidade de ação deste virus, o que se indaga é se um preparado é mais, ou menos potente que outro, e qual a relação existente entre as duas potencias. E' evidente que, neste caso, a dose de virus empregada só tem por objetivo revelar as diferenças porventura existentes e a sua latitude. Mas já isso importa numa discriminação, pois doses de virus exageradamente fracas ou exageradamente elevadas podem contribuir para perturbar, antes que realçar, a diferenciação desejada. Demais, é preciso considerar que frequentemente a dosagem de antigeno vacinante tem uma significação pratica imediata, no sentido de demonstrar si este antigeno é capaz de cumprir seu objetivo, de pôr a coberto de uma infecção natural

os individuos de uma comunidade inoculada, mesmo os mais sensiveis e os menos imunizaveis dentre eles.

A seleção da dose de prova de infecção deve portanto ser regulada por estas duas condições:

a) — ser apropriada para o evidenciamento de pequenas variações de resistencia, que são condicionadas pelas variações de potencia dos antigenos empregados;

b) — permitir um relacionamento entre a resistencia observada e a que se opõe efetivamente á infecção natural.

A admissão, como unidade de grandeza do virus, da d.l.m. no sentido mais comum, ou multiplos desta, embora preferida frequentemente nas verificações de imunidade contra a manqueira, deve ser imediatamente afastada de cogitações; na verdade ela não é uma unidade, dadas as extensas variações individuais de sensibilidade dos animais de prova e considerando que a relação entre as ações de multiplos desta quantidade não obedece tambem a uma proporção aritmetica. O animal que resiste ao que se poderia chamar 2 d.l.m., isto é, o dobro da quantidade que representaria 1 d.l.m., não é de maneira nenhuma duas vezes mais resistente que o que suporta 1 d.l.m.

A escolha de um processo de prova que, contornando a exigencia de uma unidade constante de medida do virus, se baseie na analise da reação global de grupos de individuos a uma dada dose, e portanto na porcentagem de animais mortos em consequencia da inoculação desta dose de virus, oferece certamente elementos de controle muito mais perfeitos e permite comparações mais exatas. Para se ter uma ideia das possibilidades que tal sistema oferece, basta examinar as publicações de PRIGGE & col., sobre a dosagem de antigenos vacinantes diftericos e tetanicos.

O método exige condições de sensibilidade dos animais de prova, de regularidade na ação do virus e de numero de animais para cada prova que, de acordo com as verificações aqui descritas, podem ser providas.

Tal processo permite um tratamento estatistico dos resultados obtidos, levando á sua comparação matematica. Permite o estabelecimento de um efeito vacinante padrão, e a avaliação dos minimos desvios deste. E, como consequencia fundamental, permite medir as grandezas em função do antigeno, cuja estabilidade é sempre muito superior á do virus.

Nestas condições passa a ser suficiente a escolha de uma dose de virus capaz de provocar a morte de alguns, mas não de todos os

animais previamente preparados e ulteriormente submetidos á prova de infecção.

Em consequencia de experiencias efetuadas, na base de doses que matavam 2/5 — 3/5 ou 5/5 de grupos de cinco ou dez cobaias normais, doses letais para 5/5 cobaias haviam sido, desde muito, usadas na rotina de dosagens de partidas de vacina contra a manqueira, preparadas neste Instituto, destinadas á distribuição; são culturas totais formoladas. Verificações repetidamente feitas demonstraram que partidas consideradas "normais", no sentido de vegetação franca e exuberante, ausencia de contaminações e ausencia de insucessos no uso pratico, ofereciam contra esta dose elevado indice de proteção, ocilando entre 80% e 100% de cobaias vacinadas com 1cc. Pareceu-nos entretanto que, numa dosagem mais delicada e em confronto com um antigeno padrão, doses de virus mais fracas que a letal para 5/5 animais seriam mais aptas a indicar pequenas diferenças de antigenicidade entre diversas partidas de vacina.

DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% DO VIRUS "CHAUVOEI"

Para verificar, inicialmente, qual a correlação e o efeito de doses de virus relativamente pouco distanciadas, foi efetuada a serie

TABELA 4

Protocolo de dosagem do Virus A77 (M599)

Verificação	Dose de cultura	Resultado da inoculação									
1.ª previa (8-8-44)	0,15cc	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 24 hr	OK 7 d					
	0,20cc	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 24 hr					
	0,25cc	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 24 hr					
	0,30cc	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 24 hr					
	0,35cc	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 24 hr					
2.ª previa (11-8-44)	0,05cc	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 72 hr	+ 96 hr	OK 7 d					
	0,10cc	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 48 hr	OK 7 d					
	0,15cc	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 48 hr	OK 7 d					
	0,20cc	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 24 hr	+ 24 hr					
3.ª previa (18-8-44)	0,025cc	+48	+48	+48	+48	+72	+72	OK	OK	OK	OK
	0,05cc	+48	+48	+48	+72	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	0,20cc	+24	+24	+24	+24	+24	+24	+48	+72	OK	OK
Prova definitiva, prevista para obter resultados 50% e 100%											
Definitiva (22-8-44)	0,05cc	+24	+24	+24	+24	+48	+48	+48	OK	OK	OK (70%)
	0,25cc	+24	+24	+24	+24	+24	+24	+24	+24	+24	+24 (100%)

experimental referida na tabela 4, injetando-se em grupos de 5 cobaias doses de virus dispostas em progressão aritmetica, de 0,05cc até 0,35cc, diferindo umas das outras por 0,05cc; os resultados limites foram ulteriormente confirmados, pela inoculação em grupos de 10 animais.

Pôde-se verificar que:

a) — a porcentagem de animais mortos crece, em certa medida, com o aumento do volume do virus inoculado;

b) — para que este aumento da porcentagem de mortes seja perceptivel, é necessario que as diferenças entre as duas doses não sejam muito pequenas.

No conjunto, pode-se dizer que as provas correram homogeneas e satisfatorias. Deve ser notado, entretanto, que na confirmação, em dez cobaias, da dose prevista como 50% mortal, obtivemos sucessivamente as mortalidades 4/10 e 7/10. Mais ainda, na comparação entre as doses 0,05cc e 0,025cc chegou a ser aparente uma inversão de efeitos, matando a dose maior apenas 4/10 cobaias, e a menor 6/10. Esta questão será depois discutida mais detalhadamente.

Levados pelos resultados das provas realizadas em lotes de cinco cobaias, analizadas na tabela 4, procuramos então efetuar, empregando grupos mais numerosos, o estabelecimento da curva caracteristica do virus "*chauvoei*", no intuito de localizar a posição da dose mortal 50% e tambem para confirmar ou infirmar nossa impressão de não ser praticavel a determinação desta dose, que pressupunhamos estar em posição desfavoravel na curva de frequencia.

Para esta ideia encontravamos apoio no fato de, na infecção pelo *Clostridium chauvoei*, como aliás, em maior ou menor grau, em toda infecção, deixar de ser fundamental para a evolução do processo infeccioso o numero de bacterias introduzidas no organismo, desde que não inferior ao indispensavel para o sucesso da implantação, seja pela capacidade de sobrepujar as defesas organicas imediatas, seja pelo propiciamento de ambiente favoravel á evolução e multiplicação das bacterias. Ainda em relação á manqueira, a ausencia ou raridade de recuperação de casos instalados em animais não imunes, seja natural ou artificialmente provocados, vinha em auxilio desta suposição basica.

No intuito, pois, de determinar a distribuição das mortes, em função das diferentes doses de virus inoculadas, executamos uma serie de provas que são apresentadas nas tabelas 5 e seguintes.

TABELA 5

Dosagem do virus *chauvoei* 77, cob. 599 II em 3-5-45

Cobaias inoculadas com cultura de 22 horas, em natureza ou após diluição a 1:20, tomadas as precauções anotadas no texto.

Cultura tomada no momento em que se desprendiam as primeiras bolhas de gaz, fortemente turva.

Inoculações intramusculares na coxa, por meio de seringa Record, tipo tuberculina, a 1/100cc; a diluição da cultura para a inoculação dos lotes 1-6 foi efetuada em meio idêntico ao que servira á semeadura. Cada dose foi inoculada em 4 grupos de 5 cobaias; o total de 20 cobaias de cada lote foi reunido e conservado em condições idênticas. Prazo de observação: 7 dias.

Inoculações			Morte				
Lote	Virus	Inóculo	Grupe A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Total
1	0,005cc	0,1cc	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20
2	0,0075cc	0,15cc	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20
3	0,01cc	0,2cc	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20
4	0,015cc	0,3cc	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20
5	0,02cc	0,4cc	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20
6	0,04cc	0,8cc	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20
7	0,08cc	0,8cc	5/5	5/5	5/5	4/5	19/20
8	0,15cc	0,15cc	5/5	4/5	4/5	5/5	18/20
9	0,3cc	0,3cc	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20
10	0,45cc	0,45cc	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20
11	0,6cc	0,6cc	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20
12	0,9cc	0,9cc	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20
13	1,2cc	1,2cc	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20

Para cada prova, excepto a ultima, tomavamos lotes de 20 cobaias, albinas e de peso semelhante, conservadas em condições identicas, redistribuidas ao acaso em pequenos grupos de cinco; desta forma, cada quatro grupos de cinco cobaias constituiam um lote.

Os animais de cada um destes lotes recebiam identicas porções do virus a dosar, variando as porções de lote para lote, numa sequencia geometrica.

Para a primeira serie experimental, tomamos 13 lotes de cobaias que receberam porções de virus escalonadas entre 0,005cc e 1,2cc de cultura. Não dispondo, na ocasião, de elementos para efetuar com justeza a inoculação de volumes inferiores a 0,02cc, os seis primeiros lotes receberam cultura diluida a 1:20, usando-se para essa diluição as precauções possiveis.

Na tabela 5 é apresentado o resultado desta serie experimental. Verifica-se que, inesperadamente, a simples diluição da cultura "*chau-*

TABELA 6

Dosagem do virus *chauvoei* 77, cob. 599 II em 15-5-1945

Cobaias inoculadas com cultura de 18 horas, tomadas as precauções anotadas no texto.

Cultura tomada no momento em que se desprendiam as primeiras bolhas de gaz. Fortemente turva e com ligeiro deposito.

Inoculações intramusculares na coxa por meio de seringa Record tipo tuberculina, a 1/100cc.

Cada dose foi injetada em 4 grupos de 5 cobaias; o total de 20 cobaias era conservado em idênticas condições, reunido. Prazo de observação, 7 dias.

Inoculações		Mortes				
Lote	Virus	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Total
14	0,02cc	4/5	3/5	4/5	3/5	14/20
15	0,04cc	2/5	3/5	5/5	5/5	15/20
16	0,06cc	4/5	4/5	4/5	4/5	16/20
17	0,08cc	4/5	5/5	5/5	4/5	18/20
18	0,15cc	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20

voei" é suficiente para rebaixar, de forma extraordinaria, sua virulencia. Por esse motivo, os resultados obtidos não corresponderam á espectativa senão pela indicação do limite superior da curva caracteristica, que ficou assim determinado como igual ou menor que 0,3cc.

Uma nova serie experimental, vasada nos mesmos moldes da anterior, foi em seguida efetuada em cinco lotes de cobaias, que receberam quantidades de virus distribuidas entre as porções extremas 0,02cc e 0,15cc. Nota-se pelo exame dos resultados, figurados na tabela 6, que todas as doses empregadas mostraram-se elevadas, matando sempre mais de 50% das cobaias, e, de fato, distribuindo-se com bastante regularidade entre as doses mortais para 70 e 100% dos animais inoculados.

A terceira e a quarta serie foram portanto elaboradas no intuito de verificar a distribuição de doses inferiores áquela 70% mortal.

A terceira serie malogrou e é aqui incluida apenas para ilustrar mais uma vez as numerosas e inesperadas dificuldades involvidas na estandardização do virus da manqueira. Com efeito, esta serie, representada na tabela 7, não se diferencia tecnicamente das demais senão pelo fato de ter sido então usada, para as inoculações, uma cultura do virus 77 ligeiramente mais evoluida.

O criterio geralmente seguido na determinação e emprego do virus, era a inoculação de culturas evoluidas exatamente até o ponto

em que começavam a desprender-se bolhas gazosas. A velocidade com que a vegetação atinge este ponto é variavel de cultura para cultura, podendo ocorrer já dentro de 16 horas, ou somente em 21. No caso vertente, a evolução se deu com grande rapidez, de tal forma que, ao atingir a cultura sua 17.ª hora, já a gazogenese era intensa. Apezar disso as inoculações foram efetuadas, por não se ter de inicio avaliado a perturbação que tal fato poderia determinar. Como consequencia, encontramos uma baixa bastante pronunciada de virulencia.

TABELA 7

Ilustrando a importancia do estadio de desenvolvimento da cultura. Dosagem do virus *chauvoei* 77, cob. 599 II em 5-6-45

Cobaias inoculadas com cultura de 17 horas, tomadas as precauções anotadas no texto.

No momento do uso esta cultura se apresentava fortemente turva e muito gazogena.

Inoculações intramusculares, por meio de seringa micrometrica, na coxa. Cada dose foi injetada em 4 grupos de 5 cobaias, num total de 20 cobaias. Conservadas juntas, em idêntcas condições.

Prazo: 7 dias.

Inoculações		Mortes				
Lote	Virus	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Total
19	0,0025cc	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20
20	0,005cc	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20
21	0,01cc	0/5	0/5	0/5	1/5	1/20
22	0,02cc	1/5	2/5	0/5	1/5	4/20
23	0,04cc	2/5	1/5	2/5	1/5	6/20

TABELA 8

Dosagem do virus *chauvoei* 77, cob. 599 II

Comparação entre a virulencia de culturas em diferentes estados de desenvolvimento.

De um lado culturas fortemente gazogenicas, mais evoluidas.

De outro lado culturas com gazogenese inicial, menos evoluidas.

Serie	Estadio	Tempo de estufa	Dose	N.º de cob. mortas
A (5-6-45)	Francamente gazogena	17 horas	0,02cc	4/20
B (12-6-45)	Inicio da gazogenese	21 horas	0,02cc	13/20
C (21-7-45)	Francamente gazogena	17 horas	0,015cc	1/10
D (26-7-45)	Inicio da gazogenese	16 horas	0,015cc	8/10

Dada a grande importancia desta verificação, foi ela repetida ulteriormente, com os mesmos resultados, como se poderá observar na tabela 8, onde estão incluidas duas dosagens comparativas do mesmo virus, com culturas no inicio da gazogenese ou já fortemente gazogenas.

Como já foi declarado, a idade propriamente da cultura não tem influencia decisiva na virulencia, como aliás é facil de prever.

As tabelas 9 e 10 dão finalmente conta da distribuição de mortes provocadas por quantidades de virus de letalidade inferior a 70%. Nestas series empregamos porções de cultura de virus variando entre 0,0025cc e 0,08cc, obedecendo as experiencias, em sua tecnica, ás normas estabelecidas para as anteriores. As inoculações de quantidades menores foram então e como haviam sido na serie anterior, efetuadas por meio de seringa micrometrica.

Para as experiencias apresentadas na tabela 10 aumentamos ainda, consideravelmente, o numero de cobaias submetidas á inoculação de cada dose, não só com o fito de remediar uma evidente insuficiencia dos dados até então obtidos na zona de mortalidades baixas, como tambem no intuito de permitir uma analize estatistica mais apurada dos resultados gerais obtidos.

Na execução das provas descritas nesta tabela já não dispuzemos, para a obtenção da cultura a ser inoculada, da mesma matriz do virus *chauvoei* 77 que nos servira anteriormente. Os resultados

TABELA 9

Dosagem do virus *chauvoei* 77, cob. 599 II em 12-6-45

Cultura tomada no momento em que atingiu franco desenvolvimento, com gazogenese inicial. Inoculação intramuscular na coxa, por meio de seringa micrometrica (Lotes 24 a 27) ou seringa Record tipo tuberculina com graduação de 1/100cc (Lotes 28 e 29).

Cada dose injetada em 4 grupos de 5 cobaias, perfazendo um total de 20 cobaias, as quais foram mantidas juntas, em igualdade de condições.

Inoculadas com cultura de 21 horas, tomadas as precauções anotadas no texto.

Prazo de observação: 7 dias.

Lote	Virus	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Total
24	0,0025cc	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20
25	0,005cc	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20
26	0,01cc	1/5	2/5	2/5	2/5	7/20
27	0,02cc	4/5	4/5	2/5	3/5	13/20
28	0,04cc	4/5	5/5	4/5	5/5	18/20
29	0,08cc	5/5	5/5	4/5	5/5	19/20

TABELA 10

Dosagem do virus *chauvoei* 77, cob. 609 II em 10-11-45

Cultura tomada no momento em que atingiu franco desenvolvimento, com gazogenese inicial. Inoculação intramuscular na coxa, por meio de seringa micrometrica. Cada dose foi inoculada em um grande grupo de animais, de numero variavel conforme a dose. Estes grandes grupos foram subdivididos em lotes de 20 e ainda em pequenos lotes de 5, de maneira arbitraria.

As cobaias foram inoculadas com cultura de 17-18 horas, tomadas as precauções anotadas no texto.

Prazo de observação: 7 dias.

Volume de virus	1.º lote de 20 cobaias	2.º lote de 20 cobaias	3.º lote de 20 cobaias	4.º lote de 20 cobaias	Total	Mortalidade percentual
	Morrem	Morrem	Morrem	Morrem	Morrem	
0,005cc	0/5 0/5 0/5 0/5 = 0/20	1/5 0/5 0/5 1/5 = 2/20	0/5 0/5 0/5 1/5 = 1/20	0/5 1/5 0/5 0/5 = 1/20	4/80	5,0%
0,01cc	2/5 2/5 1/5 1/5 = 6/20	0/5 3/5 0/5 0/5 = 3/20	2/5 0/5 3/5 2/5 = 7/20		16/60	26,7%
0,02cc	2/5 2/5 3/5 0/5 3/5 4/5 = 14/30				14/30	46,7%
0,04cc	4/5 4/5 5/5 3/5 = 16/20	4/5 4/5 3/5 5/5 = 16/20			32/40	80,0%

obtidos com o novo virus, agora empregado, dão uma demonstração da possibilidade de serem conseguidas, pelo processo de preparação por nós usado, amostras de virus cuja atividade patogenica se equivale.

Verifica-se dos resultados parciais expostos nas tabelas 9 e 10, juntamente com os das tabelas 5 e 6, que os dados de distribuição da letalidade provocada pela inoculação, em lotes de 20 cobaias, de diferentes doses de cultura do virus 77, podem ser assim condensados:

Volume de cultura	1.ª serie	2.ª serie	3.ª serie	4.ª serie	Total	% mortes
0,3cc	20/20	—	—	—	20/20	100
0,15cc	18/20	20/20	—	—	38/40	95
0,08cc	19/20	18/20	19/20	—	56/60	93,3
0,04cc	—	15/20	18/20	16/20—16/20	65/80	81,25
0,02cc	—	14/20	13/20	14/30	41/70	58,3
0,01cc	—	—	7/20	6/20—3/20—7/20	23/80	28,75
0,005cc	—	—	0/20	0/20—2/20—1/20—1/20	4/100	4

Esta distribuição deixou tambem indicada aquela noção pratica de ser dificil, sinão impossivel, usando grupos reduzidos de animais, determinar com segurança a dose de cultura do *Clostridium chauvoei* capaz de provocar regularmente a morte de 50% das cobaias inoculadas.

GRÁFICO—I

DETERMINAÇÃO DA CARACTERÍSTICA DO VIRUS CHAUVOEI 77 CONFORME TREVAN

LOTES DE 20 COBAIAS

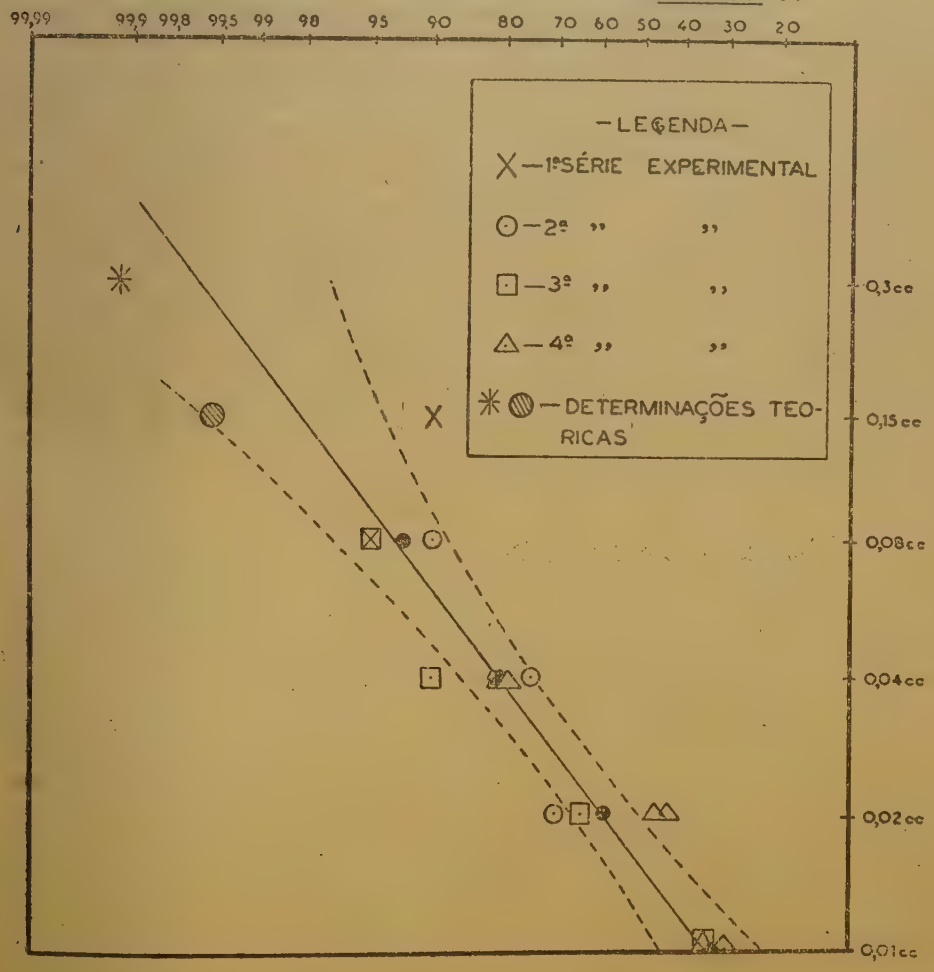
Aplicando aos resultados da 3.ª serie o método de acumulações de REED e MUENCH, pôde o Dr. A. M. PENHA, na ocasião e a nosso pedido, chegar á determinação teorica da DM50 como correspondendo a 0,0153cc de cultura. Entretanto, em comprovação ulterior e com base na ação sobre lotes de 10 animais, esta dose se mostrou exagerada, matando 80% das cobaias inoculadas.

A curva caracteristica deste virus *chauvoei*, estabelecida de acordo com o metodo de TREVAN, é apresentada no gráfico n.º I. Pareceu-nos pelo exame deste gráfico que, na pratica, poderiamos determinar com maior facilidade doses capazes de matar 60 a 90% das cobaias inoculadas. Essa nossa impressão ficou confirmada pelo es-

GRÁFICO — II

RELAÇÃO DOSE — MORTALIDADE

GRUPOS DE 20 COBAIAS INOCULADAS COM VIRUS "CHAUVOEI" 77



tudo estatistico dos dados por nós acumulados, do que se encarregou, generosamente, o Dr. A. C. ANDRADE, a quem apresentamos aqui nossos agradecimentos.

Analizando nosso material, de acordo com o método de BLISS, pôde o Dr. ANDRADE traçar a linha de regressão que se vê no gráfico n.º II. Pela analise dessa linha, verificou que os resultados obtidos em lotes de 20 cobaias podem ser considerados consistentes com a linha de regressão, em virtude do valor χ_2 estar compreendido entre 0.8 e 0.9; ha portanto indicação de um acordo satisfatorio entre os resultados obtidos e a curva teorica.

A DM50 determinada pelo método de BLISS corresponde a 0,0157cc, valor aliás quasi coincidente com o fornecido pelo tratamento estatistico conforme REED e MUENCH.

Analizando-se agora o erro de estimação, para lotes de 20 cobaias, desta dose teoricamente equivalente á DM50, verifica-se um limite de erro maior do que o que se observa com as doses superiores, por exemplo aquela teoricamente capaz de matar 80% dos animais inoculados, que no nosso caso corresponde a 0,04cc.

Temos portanto indicações, não só baseadas em resultados experimentais, como tambem apoiadas em dados estatisticos, de ter maior conveniencia pratica a padronização do virus *chauvoei* em dose superior á DM50.

A seguinte tabela, de numero 11, apresenta os limites de mortalidade que devem ser esperados, com a probabilidade de 95%, quando se injeta cultura de *Clostridium chauvoei* em grupos de 20 cobaias, nas doses teoricamente capazes de matar 33,5, 59, 81 e 94% dos inoculados, representadas em nosso caso particular pelos volumes 0,01cc, 0,02cc, 0,04cc e 0,08cc de cultura.

TABELA 11

Resultados a esperar de uma dosagem de virus *chauvoei*. Limites do erro, na base de 95% de probabilidade, quando se uzam para a determinação grupos de 20 cobaias.

Volume	Valor teorico	Erro provavel	Limites de mortalidade
0,01cc	33,5%	+ 11,3 —10	23,5% a 44,8%
0,0157cc	50%	+ 8,7 —8,7	41,3% a 58,7%
0,02cc	58,9%	+ 7,4 —7,6	51,3% a 66,3%
0,04cc	81%	+ 5,4 —6,6	74,4% a 86,4%
0,08cc	93,7%	+ 3,3 —5,6	88,1% a 97%

A analise desta tabela ainda melhor restringe o problema; deixa claramente indicada a conveniencia da escolha, como padrão, da dose teoricamente correspondente á mortal para 81 + 5,4 — 6,6% das cobaias inoculadas, a qual no caso vertente coincide com o volume de 0,04cc. Tambem fica numericamente demonstrada, na tabela, a posição desvantajosa em que se coloca a DM50, sujeita a um erro muito mais pronunciado. Chama ainda aí a atenção a ausencia de entrelaçamento entre as faixas de mortalidade das diversas doses empregadas.

A necessidade do uso de lotes de 20 animais, para a prova de cada dose de virus, pareceu-nos sucetivel de objeções de caracter economico; baseados em resultados consistentes, obtidos experimentalmente, tinhamos a esperança de ainda obter informações conclusivas com base na ação de cada dose sobre grupos de 5 animais apenas.

Infelizmente, pelo menos do ponto de vista estatistico, isso não se mostrou possivel. A analise da ação do virus sobre grupos de 5 cobaias forneceu resultados de tal forma indecisos que é impossivel tirar deles qualquer indicação estatisticamente válida.

Para se ter disso uma idéia concreta, basta observar a tabela 12, em que se apresentam as variações de mortalidade esperadas, com a probabilidade de 95%, quando se uzam para as provas grupos tão reduzidos.

TABELA 12

Resultados a esperar de uma dosagem de virus *chauvoei*. Limites de mortalidade, na base de 95% de probabilidade, quando se uzam para a determinação grupos de 5 cobaias.

Volume	Limites de mortalidade
0,01cc	15,4% a 56,6%
0,0157cc	33% a 66,9%
0,02cc	43,6% a 73,1%
0,04cc	66,8% a 90,7%
0,08cc	79,7% a 98,7%

Nota-se logo ao primeiro exame desta tabela que, dada a grande amplitude das faixas relativas a cada dose, e portanto, ao seu extenso entrelaçamento, podem ser esperados verdadeiros paradoxos nos resultados experimentais, matando doses menores um mais elevado numero de animais que outras maiores; mesmo que não ocorra essa inversão

de resultados, aliás necessariamente pouco frequente, a extensa variação do erro tiraria aos resultados experimentalmente verificados qualquer significação teorica.

Um meio termo biologicamente toleravel, embora certamente inadmissivel do ponto de vista estatistico, é o fornecido pelo uso, na determinação de cada dose, de grupos de dez animais. Analizando-os com 95% de probabilidade e em função dos resultados observados nos lotes maiores, podem-se esperar dos dados fornecidos pela inoculação de tais grupos as informações condensadas na tabela 13.

TABELA 13

Resultados a esperar de uma dosagem de virus *chauvoei*. Limites de mortalidade, na base de 95% de probabilidade, quando se uzam para a determinação grupos de 10 cobaias.

Volume	Limites de mortalidade
0,01cc	19,4% a 50,4%
0,0157cc	37,8% a 62,2%
0,02cc	48,1% a 69,2%
0,04cc	71,4% a 88,3%
0,08cc	85% a 97,8%

Verifica-se pelo exame desta tabela que existe pouco ou nulo entrelaçamento das faixas relativas ás doses individuais. Embora a amplitude do erro seja ainda larga, podemos ver que se deve esperar, do uso de lotes de 10 cobaias, uma distribuição racional das mortes.

Devemos aqui considerar que não se torna indispensavel, para a prova de imunidade, o emprego de doses de virus cujo efeito seja rigorosamente previsivel. Já vimos anteriormente que determinações experimentais efetuadas em grupos de cinco cobaias, embora carecendo de significação quando avaliadas em termos estatisticos, rigidos ou pouco flexiveis por sua natureza, não nos forneceram os resultados disparatados e incoerentes que se poderiam esperar desta ultima analise.

E' claro que o uso de um numero elevado de animais para cada prova, como é o caso dos lotes de 20 cobaias, dá ás dosagens um carater de rigorismo e exatidão que só podem influir beneficamente na confiança inspirada pelo metodo.

Entretanto, um metodo de dosagem de antigeno, com tendencia eminentemente pratica e com a pretenção de merecer adopção universal, precisa tambem atender a conveniencias de ordem economica ou executiva. Considerando os resultados acima expostos, pareceu-nos que a adopção de um numero minimo de 10 cobaias para cada prova, na determinação da atividade patogenica do virus, pode ainda ser tolerada por um estaticista que conheça tambem os problemas da biologia.

As limitações do emprego deste numero reduzido de animais, ou sejam 10 para cada prova, são naturais e evidentes. Perderão entretanto sua significação, quando nos capacitarmos da inteira desnecessidade de padronização rigorosa da dose de virus destinada á prova de infecção. Nunca é demais lembrar que o papel secundario, meramente indicador, da dose de prova de infecção, permite uma relativa latitude desta, desde que nos abstenhamos sistematicamente de referir nossa dosagem de antigeno á dose de virus empregada para a prova de imunidade, e sim, corretamente, a um outro antigeno de potencia conhecida.

Alem disso convem ter em mente que a determinação da dose de virus em grupos numerosos, como o de 20 cobaias, ou mais, sobre ser economicamente desfavoravel, não anula os inconvenientes trazidos pela imprecisão, embora os atenue.

Para a avaliação das variações da potencia antigenica de vacinas diversas, isto é, para provas de imunidade de animais anteriormente vacinados, determinações baseadas na observação de pequenos grupos de cobaias são claramente insuficientes. Neste caso torna-se obrigatorio o emprego de grupos de 20 cobaias no minimo; entretanto, doses de virus determinadas em pequenos grupos parecem fornecer, para a verificação comparativa da resistencia provocada pelos antigenos analizados, os resultados satisfatorios que são expressos pela capacidade de deixar patenteada a eficiencia relativa de cada um deles. E' claro que para preencher esta condição a latitude das variações da dose de virus empregada deve ser limitada. A avaliação previa, em grupos de dez animais, parece fornecer limitação adequada.

Para o fim de efetuar uma dosagem rigorosa do virus da manqueira e para todos os casos em que seja necessario um conhecimento mais exato do efeito da dose a ser empregada, evidentemente os grupos de dez cobaias fornecem dados insuficientes e é mesmo discutivel si grupos de vinte representam um numero bastante grande para for-

necer resultados rigorosamente significativos, do ponto de vista estatistico. Para estas observações especiais, que de forma alguma se enquadram na questão aqui discutida, necessitam-se provavelmente grupos ainda maiores.

Deve-se portanto concluir que, para a apreciação sumaria da potencia do virus chauvoei, necessaria para orientar a escolha da dose de prova de infecção de cobaias vacinadas, a simples analize do comportamento de grupos de dez cobaias já fornece elementos suficientes; esta indicação pode ser ainda melhorada pelo fato de aumentarmos para vinte o numero de cobaias de cada lote. As doses de virus mais facilmente determinaveis e menos passiveis de variação estão situadas ao nivel da que mata 80% dos animais inoculados; uma padronização de virus, para provas de imunidade de cobaias vacinadas contra a manqueira, deve portanto pautar-se em unidade de grandeza deste teor.

SENSIBILIDADE DO METODO DE DOSAGEM PROPOSTO

Para que, das verificações isoladas acima descritas, nascesse a base de um metodo racional e seguro de dosagem dos antigenos do *Clostridium chauvoei,* restaria completal-as com a determinação da proporcionalidade entre a resistencia induzida e o volume de antigeno inoculado e da latitude das variações desta resistencia, condicionadas pela sensibilidade do metodo em prova Abordando este aspecto particular do problema, fizemos inicialmente as experiencias resumidas na tabela 14, nas quais foi analizado o comportamento do antigeno Mq 133, natural, constituido de cultura total formolada; este antigeno foi inoculado, em doses variaveis entre 0,2cc e 1,5cc, em grupos de 20 cobaias, as quais foram provadas 4 semanas após, contra doses de virus-cultura matando 70% e 100% dos animais não imunizados.

Verificaram-se da experiencia efetuada os seguintes resultados:

1.º) — que havia uma relação direta entre o volume de antigeno introduzido e a resistencia adquirida, contra a inoculação ulterior de virus;

2.º) — que as diferenças de resistencia induzida eram de molde a se tornarem perceptiveis, á luz do metodo de demonstração utilizado;

TABELA 14

Dosagem do antigeno *chauvoei* Mq 133

Vacinação		Intervalo	Prova de infecção	Resultado da prova de infecção			Sobrevivencia	
Doses de antigeno	Número de cobaias			Mortas	Reagem	Não reagem	Número	%
0,2cc	20	28 dias	Virus A77M599	3	3	14	17	85
0,5cc	18	28 "	na dose de	0	1	17	18	100
1,0cc	18	28 "	0,05cc	0	0	18	18	100
1,5cc	17	28 "	(70% mortal)	0	0	17	17	100
0,2cc	20	28 dias	Virus A77M599	14	3	3	6	30
0,5cc	20	28 "	na dose de	3	3	14	17	85
1,0cc	20	28 "	0,25cc	3	1	16	17	85
1,5cc	17	28 "	(100% mortal)	2	3	12	15	88

3.º) — que havia indicação de existir uma proporcionalidade entre antigeno e resistencia, de forma a tornar possivel, da observação desta, a avaliação daquele.

Aparentemente, a dose de virus empregada, dentro dos limites observados, não teve grande influencia na interpretação final, embora tenha havido uma ligeira vantagem da dose mais elevada.

Pareceu-nos assim, com base nesta observação primaria, ser possivel estabelecer, com a orientação seguida, um metodo de dosagem dos antigenos "*chauvoei*" suficientemente preciso para fornecer elementos de distinção da potencia relativa de diferentes preparados.

Algumas imperfeições foram porem identificadas na serie experimental acima descrita. Pareceu-nos, inicialmente, que as diferenças entre as doses de antigeno provadas eram demasiado pequenas para provocarem graus de imunidade sensivelmente diferentes. Alem disso, ocorreu-nos que as desigualdades de volume do antigeno inoculado poderiam influir inespecificamente na amplitude do estimulo produzido. Verificamos, demais, que as doses empregadas eram inadequadas, pois o volume de 0,5cc de antigeno já era capaz de provocar uma imunidade de grau tão elevado que não permitia uma distinção nitida da latitude do estimulo de volumes maiores.

Foi portanto efetuada uma ultima serie experimental, na qual se procurou corrigir estes inconvenientes. Esta serie é apresentada na tabela 15. Tomamos para dosagem o antigeno Mq 146, cultura total formolada, da produção industrial do Instituto Biologico. Seu preparo ocorrera sem anormalidades.

TABELA 15

Dosagem da vacina de manqueira 146

Cobaias inoculadas subcutaneamente, na coxa esquerda, com diversos volumes da vacina 146, completando-se quando necessário, o volume de 1cc com substrato idêntico ao empregado na preparação da vacina. Nas cobaias que receberam 2,5cc, foram inoculados 1,25cc, em cada coxa. Inoculações efetuadas com seringa Record, tipo tuberculina.

Prova de infeção efetuada 30 dias mais tarde, com cultura de 16 horas, francamente desenvolvida e com gazogenese inicial, do virus *chauvoei* 77, cob. 599 II. Inoculação efetuada com seringa Record tipo tuberculina ou seringa micrometrica, conforme o volume.

Prazo de observação: 7 dias.

Vacinação		Intervalo	Prova de infecção	Resultado da prova de infecção			Sobrevivencia	
Dose do antigeno	Número de cobaias		Virus A77 cob. 599	Mortas	Reagem	Não reagem	Número	%
0,064cc em 1cc	20	30 dias	0,15cc	20	—	—	0	0
0,16cc em 1cc	20	30 "	0,15cc	14	6	—	6	30
0,4cc em 1cc	20	30 "	0,15cc	9	8	3	11	55
1cc	20	30 "	0,15cc	1	7	12	19	95
2,5cc	20	30 "	0,15cc	0	6	14	20	100
—	10	—	0,15cc	10	—	—	—	—
—	10	—	0,015cc	8	0	2	2	20

Este antigeno foi injetado em cinco lotes de vinte cobaias, nas doses de 0,064cc, 0,16cc, 0,4cc, 1cc e 2,5cc respectivamente, proporcionados portanto geometricamente na razão de 1:2,5. O volume do inóculo foi, sempre que possivel, acertado a 1cc, pelo acrecimo, quando necessario, de quantidade adequada do substrato original da vacina. Para a prova de infecção, levada a efeito 30 dias mais tarde, inoculamos em cada cobaia 10x a dose de virus 77 que, por prova simultanea, mostrou-se capaz de matar 8 cobaias em 10.

Verifica-se pelos resultados constantes da tabela 15 a existencia de uma correlação estreita entre a dose de antigeno inoculada e a resistencia das cobaias á ulterior prova de infecção.

Pode-se portanto concluir, desta serie experimental, que é possivel efetuar em cobaias á dosagem de vacinas contra a manqueira, com um grau de precisão satisfatorio, seguindo-se o metodo aqui delineado.

O tratamento estatistico dos resultados obtidos nas provas de vacinação não pôde ser efetuado, devido á insuficiencia de dados disponiveis. Uma analize sumaria do material obtido deu entretanto indicação de tender a linha de regressão do antigeno a ser paralela á do virus. Esta interessante questão será objeto de ulteriores estudos.

Um processo de dosagem apoiado em principios semelhantes aos aqui descritos vem sendo empregado na avaliação dos antigenos contra a manqueira preparados no Instituto Biologico de São Paulo, desde 1941; em conjunto, os resultados experimentais obtidos oferecem uma garantia ponderavel de sua probabilidade de exito. O antigeno preparado nesse Instituto é da categoria das culturas mortas, totais, formoladas.

O estabelecimento de um padrão estavel, termo de comparação entre preparados avaliados em ocasiões diferentes, constitue o proximo estadio no estabelecimento deste metodo de dosagem. A possibilidade de obtenção deste antigeno padrão será, eventualmente, objéto de analize.

RESUMO

Em vista da inexistencia de metodos de dosagem satisfatorios para os antigenos geralmente empregados na vacinação contra a manqueira, foram efetuadas verificações experimentais, orientadas no sentido de fornecer as bases para um metodo apoiado na medida da resistencia de cobaias, previamente vacinadas.

A cobaia foi escolhida como animal de prova por ser o mais sensivel dos animais de laboratorio á infecção pelo *Clostridium chauvoei*, e porque, sendo um animal economico e de facil reprodução, pode ser geneticamente selecionado com relativa rapidez e tomado em grupos consideraveis. Ao contrario do geralmente admitido, foi possivel demonstrar que a cobaia pode constituir um animal de prova adequado, tomadas as precauções detalhadamente anotadas no texto; destas, as mais fundamentais são o selecionamento genetico e a utilização de grupos relativamente numerosos.

Estudaram-se tambem, em detalhe, as condições de obtenção de um virus de prova conveniente. Pôde ficar bem estabelecido que o virus constituido por subcultura primaria, em Tarozzi, da hemocultura de cobaia infectada, reune as condições necessarias para ser utilizado nas provas de infecção. Discutem-se tambem no texto, detalhadamente, as circunstancias acessorias que contribuem para este efeito.

A escolha da dose mais conveniente de virus, para a prova de infecção, foi objeto de detalhadas averiguações. Chegou-se á ideia de que a unidade basica para a escolha desta dose pode ser fornecida pela ação do virus em grupos de dez cobaias. Experiencias efetuadas com doses correspondentes ao decuplo da que provoca a morte de ±80% das cobaias normais inoculadas resultaram satisfatorias.

Aparentemente a escolha de doses 50% mortais como unidade basica não se mostrou tão favoravel como a de doses ocilando em torno da 80% mortal.

Para a determinação desta dose 80% mortal, o emprego de lotes de vinte cobaias fornece resultados estatisticamente valiosos e é rejeitado apenas em virtude de considerações economicas.

Pela analize estatistica dos resultados da inoculação, em cobaias, de doses geometricamente espaçadas de culturas do *Clostridium chauvoei*, ficou evidenciado que a distribuição das mortalidades é normal.

A sensibilidade do metodo aqui descrito foi verificada como suficiente. Os efeitos de doses de vacina diferentes entre si na razão de 1:2,5 mostraram-se perfeitamente distinguiveis e proporcionados.

CONCLUSÕES

1) — E' possivel dosar vacinas de manqueira pelo metodo de medida da resistencia de animais, previamente vacinados, a uma certa dose de virus.

2) — A cobaia é um animal de prova safisfatorio, desde que tomada em grupos substanciais e submetida a selecionamento genetico.

3) — Subculturas primarias em Tarozzi, de hemocultura de cobaia infectada, constituem uma fonte de virus conveniente para a prova de infecção dos animais vacinados.

4) — A seleção da dose de virus para a prova de infecção deve ser feita na base de doses ±80% mortais para grupos de 10, ou de 20 cobaias. O uso atual do decuplo desta dose basica mostrou-se favoravel ao evidenciamento do grau de imunidade adquirido pelas cobaias vacinadas.

5) — Doses de um mesmo antigeno, diferenciadas entre si na razão de 1:2,5, mostraram-se perfeitamente distinguiveis e proporcionadas, quando submetidas á dosagem por este metodo.

Deixamos aqui registrados nossos agradecimentos a L. G. Vasconcelos, pelo seu eficaz auxilio tecnico; a Dr. V. Carneiro e R. L. Araujo, que reviram os originais; a Dr. A. M. Penha, Dr. A. A. Bitancourt e Dr. A. C. Andrade pelos conselhos e auxilio prestados na analise estatistica de nossos resultados.

STUDIES ON BLACK-LEG: — DETERMINATION OF THE ANTIGENIC POTENCY OF *CLOSTRIDIUM CHAUVOEI* VACCINES

Abstract

A method for the determination of the antigenic potency of Clostridium chauvoei vaccines is not yet extant. Some experimental studies directed to this finality are here presented. They are based upon the measure of the resistance of vaccinated guinea-pigs.

This animal was selected for our tests because of its sensitivity and because of the convenience offered by its breeding, which permits of the use of a considerable number of animals, besides allowing for a genetic selection.

The guinea-pig proved to be a convenient animal for the tests, provided that special precautions were taken. Among these precautions, genetic selection and the use of a considerable number of animals are the most important.

The conditions leading to the obtainment of a convenient virus, to be used in the immunity tests, were also minutely scrutinized. It became established that this virus could be supplied by an artificial culture, made and maintained under specific conditions.

Statistical evidence pointed to the choice, as a basis of a standard for the immunity tests, of the culture dosis bringing about 80% mortality, in groups of 20 guinea-pigs. Percentage Mortality is normally distributed, in regard to the logarithm of the volume of culture.

Apparently, and supported only by experimental evidence, the determination of this standard can be made in groups as small as 10 guinea-pigs.

The method tentatively described in this paper proved to be sufficiently accurate. Antigen doses differing in the ratio 1:2.5 induced distinguishable and proportionate effects.

BIBLIOGRAFIA

Bliss, C. I. — 1935 — The calculation of the dosage-mortality curve. *The Annals of applied Biology*, **22**: 134-167.

Braga, A. — 1942 — Sôros, vacinas, alérgenos e imunigenos. *Serv. Inform. Agric.*, Min. Agric., Rio de Janeiro, **3**: 29-57.

Braga, A. — 1943 — Sôros, vacinas, alérgenos e imunigenos. *Serv. Inform. Agr.*, Min. Agric., Rio de Janeiro, **4**: 214-250.

Dacorso Filho, P. — 1940 — Contribuição ao estudo da estandardização da vacina contra o carbunculo simtomatico. *Tese.* Escola Nacional de Veterinaria, Rio de Janeiro.

Goss, L. W. & J. P. Scott — 1918 — Standardization of black-leg vaccine. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, **54**: 234-243.

HENDERSON, D. W. — 1932 — Studies on Clostridium chauvoei: II: Active immunizaton with pure "O" antigen. *Brit. Journ. Exper. Pathol.*, **13**: 421.

ISTRATI, G., L. KICKSCH & R. PRIGGE — 1939 — Experimentelle Untersuchungen über aktive Tetanus-Immunität. II: Die Beziehung zwischen dem antigenen Reiz und der Antitoxinbildung. *Centr. Bakter.*, **I, O, 145**: 19-24.

ISTRATI, G., L. KICKSCH & R. PRIGGE — 1940 — Experimentelle Untersuchungen über aktive Tetanus-Immunität: III: Die Messung der Wirksamkeit von Tetanus-Impfstoffen. *Centr. Bakter.* **I, O, 145**: 233-40.

MASON, J. H. — 1936 — The Toxin of Clostridium chauvoei. *Onderstepoort Journ. Vet. Sc. a. An. Ind.*, **7**: 433-482.

NITTA, N. — 1918 — Investigations on black-leg immunization. *Journ. Amer. Vet. Med. Ass.*, **6**: 466-482.

PRIGGE, R. — 1939 — Diphterie-Schutzimpfung mit hochaktiven Impfstoffen. *Ergebn. d. Hyg., Bakter., Immf. u. exper. Ther.*, **22**: 1-68.

REED, L. J. & H. MUENCH — 1938 — A simple method of estimating fifty percent end-points. *Amer. Journ. Hyg.*, **27**: 493-497.

REICHEL, J. & J. E. SCHNEIDER — 1932 — Black-leg aggressin immunization. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, **34**: 768-775.

RODRIGUES, C. — 1945 — Estudos sôbre a manqueira: Do preparo e controle da vacina formolada. Arq. Inst. Biologico, S. Paulo, **16**: 217-242.

SCHEUBER, J. R. — 1931 — Black-Quarter and Malign Oedema. A new method for the preparation of a bivalent Vaccina against Bac. chauvoei and Vibrion septique. *17th Rpt. Dir. Vet. Serv. a. An. Ind.*, Union of South Africa, p. 193-196.

SCOTT, J. P. — 1926 — A method of increasing the virulence of Clostridium chauvoei by the use of ferric salts. *Journ. Inf. Dis.*, **38**: 511-513.

SCOTT, J. P. — 1932 — Black-leg vaccines. Their production and use. *Technical Bull.* n.º 10, Kansas Agric. Coll., Manhattan.

TREVAN, J. W. — 1927 — The error of determination of Toxity. *Proced. Roy. Soc.*, Series B, **101**: 483-514.

———o———

Vol. 16 — Art. 20 Novembro de 1945

ESTUDOS SÔBRE A "MANQUEIRA"
DA EFICIENCIA VACINANTE RELATIVA DE CORPOS BACTERIANOS LAVADOS E DE FILTRADOS LIVRES DE GERMENS

POR

C. Rodrigues

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Um problema ainda não completamente resolvido, na questão do mecanismo de ação das vacinas, na criação de uma resistencia á infecção natural ou artificial pelo *Cl. chauvoei*, é o da natureza e consequente localização do antigeno ou dos antigenos implicados neste efeito.

Apezar das verificações de HENDERSON, 1932, 1933, reforçadas mais recentemente pelas observações de LIVE, 1940, segundo as quais o unico antigeno responsavel pela instalação da imunidade á infeção pelo *Cl. chauvoei* seria o antigeno somatico termoestavel, ainda se encontram, em literatura, manifestações de resistencia á adopção deste criterio.

Pode-se dizer que a base fundamental dessa resistencia seja o fato, já anotado em 1900 por LECLAINCHE e VALLÉE e frequentemente observado por autores subsequentes, de filtrados de cultura do *Cl. chauvoei* gozarem da propriedade de favorecer o estabelecimento da infeção, quando postos em contacto com germens aquecidos ou lavados, isoladamente inativos.

Além disso, a perda pronunciada de potencia antigenica de celulas lavadas, em confronto com a cultura total de que se originaram, o poder vacinante não desmentido de filtrados de cultura, total ou quase totalmente desprovidos de germens, reforçam a suposição de existirem, além das bacterias, elementos efetivos para a criação de imunidade, dissolvidos no meio ambiente. De fato, BOSWORTH em 1930, DE MOULIN em 1939, e VALLÉE, 1939, insistem na possibilidade de existir, ao lado da imunidade antibacteriana, uma imunidade "anti-agressinica". Além disso, ROBERTS 1933 e MASON e SCHEUBER, 1936, registam o enfraquecimento da capacidade vacinante dos corpos bacterianos, quando libertados por lavagem das substancias dissolvidas no substráto.

No decorrer de uma tentativa de estabelecimento de um metodo de dosagem padronizavel, para a aferição dos antigenos vacinantes contra o *Cl. chauvoei*, tornou-se necessario conhecer, com maior exa-

tidão, a verdadeira constituição destes antigenos, como base de estudos da sua conservação.

Esta comunicação dá publicidade a uma verificação preliminar, cujos resultados parecem indicar uma complexidade bastante acentuada, si não da composição do antigeno "*chauvoei*", pelo menos do problema abordado.

Para esta primeira investigação, resolvemos tomar como tema a comparação dos valores antigenicos relativos de cultura liquida total, formolada, do *Cl. chauvoei*, em contraposição ao decantado, quasi livre de germens, e ao deposito obtido por centrifugação destes.

MATERIAL E METODOS

O metodo adotado para esta verificação foi o seguinte: tomámos como base culturas liquidas formoladas, do *Cl. chauvoei*, preparadas de acordo com o processo habitual neste Instituto, para fabricação de vacina contra a manqueira, processo que foi objeto de recente publicação.

Estas culturas-vacinas, bem emulsionadas, eram inoculadas em doses variaveis em grupos de 20 cobaias, para verificação ulterior da imunidade provocada. Ao mesmo tempo, uma parte destas mesmas culturas-vacinas era levada ao centrifugador, separando-se ai as bacterias mediante centrifugação a 2000-2500 RPM, durante 30'.

O deposito obtido, constituido pela grande maioria das bacterias presentes, era lavado em solução fisiologica e recentrifugado, durante o mesmo tempo e á mesma rotação, sendo finalmente emulsionado em solução fisiologica.

A perda de bacterias ocorrida durante o tratamento oscilava entre 30 e 40%, pelo que a emulsão final era calculada de fórma a compensar esta perda.

O sobrenadante da primeira centrifugação, constituido portanto do liquido de cultura, contendo ainda, por estimativa, 10% dos germens originais, era decantado e filtrado em placa de asbestos, conforme Seitz e chamada "placa esterilizante", a qual, embora não retenha a totalidade das bacterias, fornece um filtrado absolutamente limpido, livre de germens ao exame microscopico. Esta filtração se faz com grande rapidez e, segundo BOSWORTH, 1930, não retem antigeno.

Com a emulsão de germens lavados e com o filtrado, obtidos como acima se descreveu, tambem se inocularam quantidades variaveis em lotes de 20 cobaias.

Para as inoculações, usamos cobaias albinas de peso homogeneo, de cerca de 350 gramas, o que implica uma idade, tambem aproximada, de 4 mezes. Após 28-30 dias de espera, essas cobaias eram submetidas á prova de infecção, para a qual utilizavamos o virus 77, de proveniencia europeia e a nós enviado por HENDERSON, o qual constitue a nossa amostra padrão do *Cl. chauvoei*, para provas desta natureza.

As partidas de cultura-vacina utilizadas nesta serie foram as de numeros 127, experimental, 129 e 133, "*standard*", preparadas respectivamente em 19.1.44, 19.2.44 e 16.6.44. Para sua preparação foi utilizada a amostra 43, de origem brasileira e normalmente empregada para o preparo de nossas vacinas.

A historia das tres vacinas utilizadas póde ser rapidamente resumida da seguinte maneira:

Partida 127) — Experimental — Volume 3,5 lts. Substrato "normal". Vegetação regular, 3 ds. Formolada a $8^0/_{00}$, ficando completamente avirulenta e estéril apóz 24 hrs. a 37°C. Contagem hematimetrica = 240 milhões/cc.

Partida 129) — "standard" — volume 25 lts. Substráto "normal". Vegetação regular, 2 ds. Formolada a $8^0/_{00}$, ficando completamente avirulenta e esteril após 24 hrs. a 37°C. Contagem hematimetrica = 160 milhões/cc.

Partida 133) — "standard" — 25 lts. Substráto "normal". Vegetação bôa, embora retardada, 3 ds. Formolada a $8^0/_{00}$, ficando completamente avirulenta e esteril após 24 hrs. a 37°C. Contagem hematimetrica = 418 milhões/cc.

PARTE EXPERIMENTAL

Numa primeira triagem, efetuada com a partida 127, foram tomados seis lotes de cobaias, que receberam ou a cultura total, ou o sobrenadante, ou o culote do centrifugado. Tratando-se aqui de uma experiencia indicadora, deixaram de ser tomadas precauções que ulteriormente se demonstraram decisivas, tais como a filtração, em placas de Seitz, do sobrenadante da centrifugação, e a avaliação das perdas de bacterias sofridas durante a centrifugação e a lavagem. Como resultado destas imperfeições tecnicas, obtivemos proteção em grau elevado pelo liquido sobrenadante, provavelmente ainda muito rico em germens; tambem, deixando de levar em consideração as perdas decorrentes do processo, utilizamos numero excessivamente baixo de bacterias nas provas efetuadas com culote lavado.

Apezar dessas deficiencias, a primeira serie deixou demonstrado que a cultura total é melhor agente imunizante que uma quantidade correspondente de bacterias lavadas, e que um volume correspondente de sobrenadante de centrifugação, empobrecido em germens. Isto se vê claramente na tabela 1.

TABELA 1

Valor comparativo da proteção conferida á cobaia pela cultura total formolada, pelo sobrenadante e pelo deposito da cultura centrifugada. Partida 127.

Vacinação			Prova de infecção
Tipo do inoculo	Volume	Numero de germens (*) em milhões	Resistem à infecção ulterior (**)
Total	1cc	240	18/20
Sobrenadante	5cc	—	18/20
"	2cc	—	9/20
Deposito	1cc	720?	13/20
"	1cc	288?	8/20
"	1cc	144?	8/20

NOTAS: — (*) — O numero de germens no deposito lavado foi calculado por estimativa.
(**) — A prova de infeção foi efetuada com uma dose de virus que matou 5/5 testemunhas, inoculadas simultaneamente.

Uma segunda verificação, efetuada com a partida de n.º 129, deixou demonstrado que mesmo doses tão baixas como 1 cc de sobrenadante do centrifugado não filtrado ou cerca de 100 milhões de bacterias lavadas ainda são capazes de provocar na cobaia uma resistencia completa a dose de virus suficiente para matar 12/20 testemunhas. Nesta segunda série de experiencias, constituida de sete grupos de cobaias, inoculamos respectivamente:

1cc de cultura total formolada;

10cc, 3cc e 1cc de sobrenadante desta cultura, centrifugada a 3000 RPM 30';

974 milhões, 292 milhões e 97,4 milhões de germens lavados, correspondendo a 6cc, 1,8cc e 0,6cc da cultura original;

Todas as cobaias resistiram á dose de prova, quando verificadas um mez depois.

Em consequencia dos resultados obtidos nas duas séries acima descritas, a terceira série experimental foi mais amplamente desenvolvida. Utilizamos aqui a partida numero 133, com a qual vacinamos 22 grupos de 20 cobaias cada um.

6 grupos receberam a vacina total, nas doses de 0,2cc, 0,5cc e 1,5cc, cada dose inoculada em dois grupos distintos.

O sobrenadante da centrifugação a 2.000 RPM durante 30', filtrado em seguida em placa de asbesto, "esterilizante", conforme Seitz, foi injetado em 4 series de 2 grupos, nas doses de 0,2cc, 0,5cc, 1,5cc e 4,5cc.

Finalmente, as 4 ultimas series receberam respectivamente 69,6 milhões, 209 milhões, 627 milhões e 1.881 milhões de bacterias lavadas, correspondentes a 0,167cc, 0,5cc, 1,5cc e 4,5cc da cultura-vacina original.

A prova de imunidade destas cobaias foi efetuada 4 semanas depois da vacinação; tomamos para ela duas diferentes doses infectantes do virus 77; foi calculada uma dose capaz de matar 50% das cobaias testemunhas, e outra capaz de matar a totalidade. Atualmente, verificou-se que a dose calculada como 50% mortal era ligeiramente mais energica, matando 70% das testemunhas. A dose tomada como seguramente mortal, previamente determinada, correspondia a um volume cinco vezes maior.

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos. Analisando-se comparativamente a capacidade imunizante dos diversos inoculos, verifica-se que, em dose equivalente, a cultura total foi capaz de determinar uma imunidade de nivel muito superior à fornecida, quer pelas bacterias lavadas, quer pelo filtrado. Aparentemente, a relação volumetrica entre doses equieficientes foi de 1:3, tanto no que se refere á comparação cultura-germens lavados, como na relação germens lavados-filtrado, considerando-se os germens lavados, para esta comparação, em termos de sua concentração inicial na cultura vacina.

TABELA 2

Valor comparativo da proteção conferida à cobaia pela cultura total formolada, pelo sobrenadante filtrado e pelo deposito da cultura centrifugada. Partida 133.

Vacinação			Prova de infecção		
Tipo do inoculo	Volume	Numero de germens (Milhões)	Resistem á infecção ulterior		Testemunhas
			Dose 70% mortal	Dose 100% mortal	
Total	0,2cc	83,6	17/20	6/20	
"	0,5cc	209	18/18	17/20	
"	1,5cc	627	17/17	15/17	0,05cc mata
Sobrenadante . .	0,2cc	—	8/19	0/20	7/10
" . .	0,5cc	—	5/19	0/20	cobaias
" . .	1,5cc	—	15/18	4/19	
" . .	4,5cc	—	18/19	13/19	
Culote	1cc	69,6	16/18	3/18	0,25cc mata
"	1cc	209	16/19	4/19	10/10
"	1cc	627	18/19	8/17	cobaias
"	1cc	1881	16/16	17/19	

DISCUSSÃO

Decorre das experiencias efetuadas que o sobrenadante de culturas totais formoladas, desprovido quase completamente de germens por centrifugação e imediata passagem em filtro Seitz, é capaz de provocar em cobaia uma imunidade de nivel bastante elevado, desde que se empreguem doses substanciais. Considerando-se o fato de se tratar aqui de uma cultura recente, apenas de tres dias, a possibilidade de lise bacteriana e consequente passagem em solução do antigeno somatico ficaria muito diminuida.

Outro ponto de apoio para a hipotese da existencia de uma fração antigenica, constantemente presente no liquido de cultura, seria a potencia imunizante relativamente baixa dos corpos bacilares, libertados por centrifugação e lavagem do material em solução.

Que o antigeno presente nas bacterias lavadas é capaz de gerar uma imunidade completa á infecção pelo *Cl. chauvoei*, não permitem duvida as verificações de HENDERSON em 1932 e, especialmente, em 1933, quando pôde demonstrar que soros preparados exclusivamente com o antigeno somatico termoestavel eram inteiramente eficientes para a proteção passiva. Além disso, o fato observado por LIVE, 1940, de germens de culturas muito novas, lavados e formolados, provocarem no coelho anticorpos que reagem com os antigenos existentes nas agressinas e filtrados, prova que os ultimos contem material soluvel proveniente da desintegração das celulas bacterianas; não é, pois, impossivel nem improvavel que forneçam, embora em gráu mais fraco, imunidade do mesmo caracter que a induzida pelos proprios corpos bacterianos.

Segundo as experiencias aqui relatadas e de acôrdo com as observações de outros investigadores, podemos admitir que a imunidade á infecção pelo *Cl. chauvoei* é dependente do antigeno "0'. Que este antigeno existe tambem, em pequena concentração, nos filtrados de cultura mesmo muito recente, torna-se extremamente provavel.

Além disso, MASON deixou demonstrado em 1936 que as toxinas produzidas pelo *Cl. chauvoei* não actuam de nenhuma maneira no estabelecimento de imunidade á infeção.

Restaria pois esclarecer o motivo pelo qual as emulsões bacterianas lavadas conferem, em igualdade de concentração, uma imunidade mais fraca que as culturas originais, conforme verificação de ROBERTS, 1933, de MASON e SCHEUBER, 1936, de VALLÉE, 1939, e também nossas.

Devemos provisoriamente admitir que existem em solução, no filtrado de cultura, factores especificos ou não, cuja atuação, seja

sôbre o organismo vacinado, seja sôbre as bactérias, reforça notavelmente a imunidade obtida. A natureza destes fatores e o mecanismo de sua ação não estão identificados.

De Moulin, 1939, estudando a fagocitóse em coelhos, inoculados na orelha com cultura formolada e ulteriormente com virus, ou, de outro lado, com filtrado de cultura seguido de virus, acredita ter podido diferenciar a influencia preparatória de dois antigenos, admitindo que a cultura formolada provoca uma exaltação da fagocitóse, ao passo que a inoculação de filtrado cria um ambiente desfavoravel á multiplicação dos germens, ulteriormente introduzidos. Esta observação é tanto mais notavel quanto inesperada, pois é evidente que o filtrado de cultura não tem nenhum elemento, além dos já presentes na cultura formolada; as verificações de De Moulin nos levariam portanto a admitir, na cultura, a existencia, a mais, de fatores não filtraveis, impedientes da ação do filtrado, ou a supor que o formol destróe esse fator, que condiciona a inibição do *Cl. chauvoei*. Considerando-se a admissão generalizada, de provocarem as vacinas e filtrados formolados uma melhor resposta imunitária, mesmo esta segunda hipótese nos conduziria, forçadamente, a admitir a não participação desse fator de inibição no estabelecimento da imunidade á manqueira.

Torna-se portanto necessario estudar e conhecer a natureza do fator provavelmente existente em solução nas culturas formoladas do *Cl. chauvoei*, e cuja presença triplica o efeito da inoculação de germens lavados.

RESUMO

Existem ainda algumas objeções ao ponto de vista desenvolvido por Henderson, o qual responsabiliza pelo efeito vacinante contra a manqueira o antigeno somatico termoestavel, em carater exclusivo.

As bases da resistencia á adopção desta ideia são, principalmente, a ação "agressiva" dos filtrados de cultura e a diminuição pronunciada do poder antigenico de celulas lavadas.

Lançando mão de um metodo convenientemente sensivel de avaliação da imunidade á manqueira, procuramos estabelecer a relação existente entre o efeito vacinante produzido pela inoculação de culturas totais formoladas, comparado com o do sobrenadante filtrado e o do culote lavado, obtidos por centrifugação desta mesma cultura.

Os resultados das diversas series experimentais efetuadas indicam que:

a) celulas lavadas conferem solida proteção;

b) o sobrenadante do centrifugado, filtrado, ainda é capaz de conferir uma proteção evidente;

c) o efeito vacinante da cultura total é muito maior que o das bacterias lavadas, e muito maior ainda que o do sobrenadante filtrado.

Volumes equieficientes destes tres preparados teem entre si a relação 1:3:9, aproximadamente.

Em consequencia dos resultados experimentais obtidos, torna-se provavel a existencia, no sobrenadante filtrado de culturas totais formoladas, de um fator que exagera o efeito imunizante das celulas. Havendo numerosas evidencias de ser o antigeno somatico capaz de, por si, proteger contra a infecção pelo *Cl. chauvoei*, ha indicação de ser este fator soluvel de natureza inespecifica. A hipotese de perda do antigeno, em consequencia do processo de centrifugação e lavagem das celulas, torna-se remota, dada a grande estabilidade do antigeno somatico.

CONCLUSÕES

a) — Germens centrifugados e lavados de uma cultura formolada de *Cl. chauvoei* conferem imunidade á manqueira. Esta imunidade, embora apreciavel, não é comparavel á provocada por um volume correspondente da cultura formolada original.

b) — Sobrenadante filtrado do centrifugado de cultura formolada do *Cl. chauvoei* confére certo grau de imunidade á manqueira, desde que inoculado em doses substanciais.

c) — E' provavel a existencia, em solução, nas culturas-vacinas, além de uma certa quantidade de antigeno "0", de fatores específicos ou inespecíficos que atuam, seja no organismo vacinado, seja nas bactérias, reforçando notavelmente a imunidade obtida.

Deixamos aqui consignados nossos agradecimentos a L. G. Vasconcelos, pela sua ajuda técnica; ao Dr. Vitor Carneiro, que gentilmente reviu os originais; a R. L. Araujo, por seu auxilio na redação do resumo em inglez.

STUDIES ON BLACK-LEG: — THE RELATIVE ANTIGENIC POTENCY OF WASHED BACTERIAL CELLS, AND OF GERM-FREE CULTURE FILTRATES

Abstract

Since Henderson demonstrated the importance of the somatic heatstable antigen of Cl. chauvoei in the induction of immunity from black-leg, a few doubts have been raised about the claimed exclusivity of this antigen in the establishment of immunity to the infection.

The principal reasons for these doubts are, in the first place, the admitted "aggressive" action of Cl. chauvoei filtrates, and secondly, the pronounced decrease of activity suffered by the bacterial cells, when liberated from the substances dissolved in the substratum by successive washings.

The development of a tentative method for measuring the activity of Cl. chauvoei antigens, described in a previous paper, led us to the verification of the quantitative relationship between a formolized whole culture of Cl. chauvoei, their washed cells and also the supernatant of their centrifugate, as to their antigenic activity.

The results of our experiments indicate that:

1) — A high level protection is conferred to guinea-pigs by the inoculation of washed cells of a recent formolized culture of Cl. chauvoei.

2) — The supernatant of the centrifugate of same culture, rid of probably the totality of cells by filtration through Seitz filter, presents some antigenic activity, though very weak.

3) — The antigenic activity of the formolized whole culture is of a much higher level than that exhibited by the washed cells.

Equiefficiency was nearly attained by these three preparations when used in the following proportions; 1 vol. whole culture = 3 vols washed cells = 9 vols supernatant.

As a consequence of the above experiments, we admit as probable the presence in the supernatant of formolized whole cultures — besides some dissolved "O" antigen — of a factor which amplifies the immunizing effect of washed cells. As regards the proved efficiency of the somatic antigen, for the protection against black-leg, there exists an indication of nonespecificity of that soluble factor.

The probability of antigenic decrease, — as a consequence of the manipulations to which the cells are submitted — is supposed to be remote, if we consider the high stability of the somatic antigen.

BIBLIOGRAFIA

BOSWORTH, T. J. — 1930 — Black-leg (Vaccination). *Rept. 11th Intern. Veter. Congress*, London, 3: 199-212.

HENDERSON, D. W. — 1932 — Studies on Cl. chauvoei. II: Active immunization with pure "O" antigen. *Brit. Journ. Exper. Path.*, 13: 421.

HENDERSON, D. W. — 1933 — Studies on Cl. chauvoei. III: Passive protection with pure "O" sera. *Brit. Journ. Exper. Path.*, 14: 108-112.

LECLAINCHE, E. e H. VALLÉE — 1900 — Recherches experimentales sur le charbon symptomatique. *Ann. Inst. Pasteur*, 14: 513-534.

LIVE, I. — 1940 — Studies with Cl. chauvoei (Black-leg) agressin. *Journ. Immunol.*, 39: 137-162.

MASON, J. H. — 1936 — The toxin of Cl. chauvoei. *Onderstepoort Journ. Vet. Sci. a. Animal Ind.*, 7: 433-482.

MASON, J. H. e J. R. SCHEUBER — 1936 — The production of immunity to Cl. chauvoei. *Onderstepoort Journ. Vet. Sci. a. Animal Ind.*, 7: 143-165.

MOULIN, F. W. K. de — 1939 — Onderzoek naar den aard der immuniteit tegen boutvuur. *Ned-ind. Blad. Diergeneesk.*, 51: 35-61. Tambem resumo em *The Veterinary Bulletin*, 1940, 10: 748.

ROBERTS, R. S. — 1933 — The practical value of the heat-stable antigen of Cl. chauvoei as an immunizing agent. *Journ. Comp. Pathol. a. Therap.* 46: 56-61.

RODRIGUES, C. — 1945 — Estudos sôbre a manqueira: — Determinação da potencia antigenica de vacinas contra Clostridium chauvoei. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 16: 265-296.

VALLÉE, H. — 1939 — Sur les facteurs adjuvants de la vaccination. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 208: 1125-1127.

———o———

Vol. 16 — Art. 21

Novembro de 1945

INDÍCIOS DA EXISTÊNCIA DE UMA SUBSTANCIA ANTINEOPLÁSICA FORMADA NOS LÍQUIDOS DE CULTURA DO "PENICILLIUM NOTATUM"

POR

J. R. Meyer

Do Instituto Biologico de S. Paulo

No transplante de tumores passiveis de crescimento por enxertia é frequente o aparecimento de necróses centrais consequentes às bacterias que se desenvolvem em seu interior. Tentando verificar se o tratamento de fragmentos contaminados, feito com o líquido de cultura do *P. notatum*, impedia o aparecimento dessas necróses, foi-nos possivel verificar que os pedaços do neoplasma, deixados a temperatura baixa e durante algum tempo em contacto com o líquido de cultura, perdiam a propriedade de reproduzir o tumor.

O tumor usado para as experiências em apreço foi primitivamente um adenocarcinoma mamário que perdera o carater adenomatoso. Esse tumor vem sendo mantido ha diversos anos em nosso laboratório e cresce em 100 por cento dos animais enxertados, adquirindo o tamanho de uma nóz, dentro de 4 ou 5 semanas.

A observação relativa à atividade do líquido de cultura do *P. notatum* sobre o tumor foi confirmada numerosas vezes em experiências feitas de acordo com os seguintes detalhes:

Os fragmentos a serem tratados eram obtidos na 3.ª semana de desenvolvimento do tumor. Em cada experiência fragmentos de cerca de 3 mm de diâmetro eram divididos em dois lótes; um destes era colocado numa pequena caixa de Petri com cerca de 20 ml. de solução de Tyrode, e outro colocado numa caixa de Petri do mesmo tamanho, contendo 20 ml. de líquido de cultura de *P. notatum* com 7 a 15 dias de desenvolvimento a 22°C. As caixas de Petri eram postas numa geladeira a uma temperatura de 4°C, durante 72 a 96 horas; em seguida os pedaços de tumor eram enxertados debaixo da péle de lótes de camondongos sensiveis ao tumor. Os camondongos enxertados eram examinados semanalmente e os resultados finais registrados no fim da 8.ª semana após as inoculações. O líquido usado para as culturas do *P. notatum* era uma modalidade da fórmula de Czapek-Dox um pouco modificada, tendo a seguinte composição:

Nitrato de sódio	3,0 gm
Fosfato monobásico de potássio	1,0
Sulfato de magnésio	0,5
Cloreto de zinco	0,1 - 0,05
Sulfato ferroso	0,05
Lactose	40,0
Água	1000 ml
Extrato aquoso de levedo	10 ml

Esse líquido era ajustado a um pH = 6,8 e esterilizado em frascos de Erlenmeyer. O *P. notatum* cultivado era a amostra designada pelo n.º 824 do laboratório Squibb, a qual nos foi cedida pelo Dr. A. A. BITANCOURT. As semeaduras eram feitas com semeaduras antigas de *P. notatum* feitas em meio sólido com suco de tomates. As culturas no líquido referido, crescendo na temperatura ambiente de 18º a 22ºC, ao cabo de 7 dias já apresentavam uma franca pigmentação amarela que se tornava mais intensa do décimo-segundo ao décimo-quinto dia. Por essa época o seu poder bacteriostático, provado com amostras sensiveis de *Staphylococcus*, variava entre 30 a 50 unidades Oxford por ml.

No quadro seguinte estão registrados os dados de três experiências feitas nas condições descritas, com três exemplares de tumor.

QUADRO N.º 1

Resumo das primeiras experiências mostrando a ação antineoplásica do líquido de cultura de *Penicillium notatum*, verificada "in vitro" sôbre um tumor transplantavel de camondongo.

Experiências	N.º de fragmentos tratados durante 4 dias a 4ºC, por		N.º de tumores obtidos pelos enxertos do material tratado		Atividade	
	Solução salina isotônica	Líq. de cultura de *P. notatum*	Pela solução salina	Pelo líq. de cultura de *P. notatum*	Neoplásica do tumor usado para a experiência (*)	antineoplásica do líq. de cultura de *P. notatum* (**)
765	10		10		100%	
		10		0		100%
766	10		10		100%	
		10		0		100%
770	10		10		100%	
		10		0		100%
Totais	30		30		100%	
		30		0		100%

(*) A atividade neoplásica do tumor é avaliada pela porcentagem dos tumores que se desenvolveram após o enxerto do material tratado pela solução salina isotônica.

(**) A atividade antineoplásica do líquido de cultura de *P. notatum* é avaliada pela porcentagem dos resultados negativos que se observaram com os enxertos do material tratado pelo líquido de cultura a experimentar.

Como se vê, os resultados perfeitamente concordantes nas três experiências indicam que no líquido de cultura do *P. notatum* ha um fator que atua, *in vitro*, sôbre os inóculos do tumor transplantavel do camondongo.

Interessados em saber si o efeito observado era devido às substâncias que entravam na composição do meio nutritivo, realizamos ensáios com diversos componentes da fórmula, verificando que só o clorêto de zinco, quando usado na concentração de 0,5 gm por 1000 ml de água, é capaz de destruir a vitalidade dos fragmentos do tumor. Todavia, como as amostras de líquido de cultura de *P. notatum* em que era muito menor o teor de zinco demonstravam o efeito referido, fizemos outros ensáios com um meio nutritivo a que demos o nome de líquido de Czapek II e em que, em vez do sal de zinco, com os outros ingredientes, empregavamos 0,05 gm de sulfato ferroso por 1000 ml de água. Neste meio nutritivo foi possivel demonstrar mais uma vez, apesar do crescimento um pouco mais demorado do cogumelo em apreço, o aparecimento da propriedade antineoplásica de modo tão nítido como nas experiências registradas no quadro n.º 1.

Numa segunda fase destas pesquizas, para melhor conhecer a maneira como aparece a propriedade antineoplásica, empreendemos uma nova modalidade de experiências, que consistiu em fazer provas do líquido de cultura em diversos períodos de desenvolvimento do *P. notatum*.

QUADRO N.º 2

Variação da atividade antineoplásica do líquido de cultura do *P. notatum* nas diversas fases de desenvolvimento do cogumelo.

Número de camondongos empregados em cada série de experiências	Atividade antineoplásica do líquido de cultura de *P. notatum* em diversas fases de seu desenvolvimento							Atividade neoplásica dos três tumores usados para as experiências
	0-5 dias	6-10 dias	11-15 dias	16-20 dias	21-25 dias	26-30 dias	31-40 dias	
I Série (78 cam.)	0	0	0	57%	71%	42%	—	80%
II Série (91 cam.)	0	100%	100%	100%	42%	14%	8,9%	100%
III Série (39 cam.)	0	?	100%	—	—	—	—	100%

A atividade neoplásica dos tumores enxertados e a atividade antineoplásica dos líquidos de cultura foram avaliadas da maneira indicada no quadro n.º 1.

Na terceira série de experiências do quadro n.º 2 não foi tomada em consideração a atividade (42%) observada após os enxertos de material tratado pelo líquido com 10 dias de cultura, por ser precário o estado em que ficaram os camondongos enxertados, em consequência dos ferimentos que um deles produziu nos demais.

Os números obtidos nas experiências citadas são concordes em mostrar que a propriedade antineoplásica, que é nula no início do desenvolvimento do cogumelo, aumenta rapidamente, permanecendo muito ativa durante alguns dias. Depois de um periodo de atividade intensa, variavel entre cinco e quinze dias, essa atividade começa a diminuir, tornando-se nula ou quase nula depois do trigésimo dia. Estas observações foram feitas com líquidos retirados diretamente dos frascos onde cresciam as culturas. Nestas condições, pode-se dizer que a propriedade é pouco estavel quando o líquido ativo permanece na temperatura ambiente e em contacto com o lençol sobrenadante espesso formado pelas colónias confluentes do *P. notatum*.

Afim de verificar a resistência desse fator quando o líquido ativo é aquecido foram realizadas diversas experiências que consistiram em fazer agir sôbre fragmentos do tumor diversas amostras de líquidos de cultura obtidos em diversas fases de desenvolvimento e submetidos a um periodo de ebulição de 30 a 45 minutos antes de postos em contacto com os pedaços de tumor. As amostras de líquido foram filtradas através de papel e divididas em duas partes. A primeira serviu para prova da sua atividade antineoplásica nos camondongos registrados no quadro n.º 2, e a segunda foi submetida à fervura num frasco de Erlenmeyer. Como com este tratamento o líquido sofria uma redução de volume, para evitar o excesso de concentração restabeleciamos a quantidade inicial de líquido juntando a água distilada necessária para substituir a evaporada. O líquido fervido com o volume primitivo restabelecido era esfriado e posto em contacto com fragmentos dos mesmos tumores que serviram para as provas registradas no quadro n.º 2, agindo sôbre eles durante 72 horas e a uma temperatura de 4ºC.

QUADRO N.º 3

Diminuição da atividade antineoplásica do líquido de cultura do *P. notatum* em diversas fases de desenvolvimento, pela ação do calor.

N.º de camondongos empregados em cada série de experiências	Atividade antineoplásica do líquido de cultura fervido durante 30-45 minutos, nas diversas fases de crescimento do *P. notatum*							Atividade neoplásica dos dois tumores usados para as experiências
	0-5 dias	6-10 dias	11-15 dias	16-20 dias	21-25 dias	26-30 dias	31-40 dias	
I Série (42 cam.)	0%	0%	0%	28%	71%	0%	—	V. quadro 2 — I série
II Série (49 cam.)	0%	42%	100%	100%	10%	0%	0%	V. quadro 2 — II série

A atividade neoplásica dos tumores usados e a atividade antineoplásica dos líquidos de cultura do *P. notatum* foram avaliadas pelo mesmo processo indicado no quadro n.º 1.

O quadro anterior resume os dados para verificação do efeito do calor na atividade antineoplásica estudada.

Os dados coligidos indicam que a temperatura da ebulição, agindo durante 30 minutos sôbre o líquido de cultura ativo, destroi apenas uma parte da atividade antineoplásica. Comparando-se os números do presente quadro com os do quadro n.º 2 nota-se que, quando o líquido está na fase ótima de atividade, apesar de submetido a uma temperatura praticamente de 100ºC, durante 30 a 45 minutos, ainda continúa destruindo 100% do poder neoplásico. Interpretamos este fato como resultante de um teor mais elevado de princípio ativo existente nessa ocasião e apenas em parte destruido, de modo que a porção não prejudicada pelo calor é suficiente para explicar os efeitos exercidos contra o material neoplásico.

A hipótese formulada é até certo ponto confirmada pelas experiências resumidas no quadro n.º 4, onde se vê que, quando o líquido está na fase de maior atividade, apesar de diluido em volume egual de solução salina, continúa a agir, destruindo 100% do poder neoplásico de fragmentos tumorais. Com a diluição do líquido primitivo em dois volumes de solução salina a atividade fica reduzida a 85%. Sua diluição em quatro volumes reduz a capacidade antineoplásica a 14%.

QUADRO N.º 4

Diminuição da atividade antineoplásica do líquido de cultura de *P. notatum* em diversas fases de desenvolvimento em consequência de diluições dele em solução salina isotônica

Experiências	Número de camondongos empregados	Fase da cultura *P. notatum*	Atividade do líquido de cultura puro e em várias diluições em sol. salina				Atividade neoplásica dos tumores usados
			L. puro	Dil. a 1/1	Dil. a 1/2	Dil. a 1/4	
812	28 cam.	5 dias	0%	0%	0%	0%	100%
813	28 cam.	15 dias	100%	28%	0%	0%	100%
814	28 cam.	21 dias	100%	100%	85%	14%	100%

Como nos quadros anteriores a atividade neoplásica é avaliada pela porcentagem dos tumores que se desenvolvem com o material apenas submetido à ação da solução salina, durante 72 horas a temperatura de 4ºC.

A atividade antineoplásica é avaliada pela porcentagem dos tumores que não se desenvolvem pela inoculação do material submetido aos líquidos de cultura, durante 96 horas e a 4ºC.

Afim-de verificar de modo diréto a possibilidade da penicilina purificada ser a substância produtora do efeito antineoplásico, conseguimos uma grama desse produto, como é distribuido pela firma

Powers Weightman Rosengarten, de Rahway, Nova Jersey, Estados Unidos. Essa amostra foi nos gentilmente oferecida pelo laboratório Torres, que dela pôde dispor como sobra de tratamento de um particular. Suas indicações acusavam uma atividade de cem mil unidades Oxford.

Com essa penicilina purificada foi feita a seguinte experiência:

Com uma parte da amostra a que nos referimos fizemos três diluições, contendo respectivamente 1.000 unidades, 500 unidades e 250 unidades de penicilina em 20 ml de solução fisiológica. Fragmentos de tumor foram postos nessas diluições em três caixas de Petri, sendo levados imediatamente a uma geladeira onde permaneceram durante 4 dias a uma temperatura de 4°C.. Numa quarta caixa de Petri com solução salina simples foram postos fragmentos do mesmo tumor. Estes fragmentos também foram levados à geladeira com os demais e aí ficaram durante o mesmo prazo. Depois dos 4 dias os quatro grupos de fragmentos serviram para os enxertos em 4 lótes, separados, de camondongos. Ao fim de 2 semanas os resultados já eram os seguintes:

Fragmentos tratados por solução salina	100% de tumores
Fragmentos tratados por 250 unidades de penicilina . .	100% de tumores
" " " 500 " " " . .	100% de tumores
" " " 1000 " " " . .	100% de tumores

Os dados desta experiência nos levam a admitir que a penicilina purificada do comércio não tem o efeito antineoplásico demonstrado no líquido de cultura do *P. notatum*.

DISCUSSÃO

Os fatos observados repetidamente sob as condições variaveis descritas, nos induzem a concluir que o crescimento do *Penicillium notatum* confere ao meio de Czapek-Dox, tendo a composição apontada, uma propriedade antineoplásica demonstravel *in vitro*, sôbre o tumor transplantavel do camondongo que ha diversos anos vem sendo mantido no Instituto Biológico de São Paulo (3).

Essa propriedade começa a aparecer à medida que o *P. notatum* vai crescendo. No começo ela coincide com o desenvolvimento da côr amarela do meio de cultura. Sua intensidade é máxima a partir do 10° ao 15° dia de cultura conforme a composição do meio, e se mantem nessas condições durante um periodo variavel de cinco a dez dias. Ao cabo desse tempo tal propriedade principia a diminuir, tornando-se geralmente nula no 30.° dia de cultura.

Trata-se, ao que parece, da elaboração de uma substância pouco estavel, que seria total e lentamente destruida quando deixada na temperatura ambiente ou parcialmente destruida por efeito da ebulição durante 30 a 45 minutos.

Estes detalhes constituem indícios de que não seja a penicilina a substância portadora da propriedade citada. Como foi diretamente demonstrado numa de nossas experiências, a penicilina purificada do comércio não exerce propriedade antineoplásica.

Experiências idênticas feitas por CORNMAN (1944) com diversos sarcomas de rato e de camondongo (1) mostraram que "a penicilina amarela" (yellow penicillin), que é ativa sôbre diversos tumores transplantaveis com que êle trabalhou, perdia a atividade antineoplásica mediante purificação. LEWIS (1944) confirmou esses resultados (2) mostrando não só a atividade da penicilina impura, mas tambem o fato de que a penicilina pura não retarda o desenvolvimento de diversos tumores transplantaveis de camondongos nem o desenvolvimento de outros tumores transplantaveis, de ratos.

Como nos líquidos de cultura do *P. notatum* a multiplicação desse cogumelo coincide com um aumento do pH, poder-se-ia pensar que o efeito de que tratamos decorresse dessa particularidade. As experiências feitas tomando em consideração essa possibilidade, ora com solução salina pura, ora com o líquido de Czapek-Dox tendo o pH variavel entre 6,8 e 8,2 demonstraram que dentro desses limites as variações do pH não provocam efeito antineoplásico digno de registro.

Por todos esses fatos somos de parecer que, ao lado da produção de substâncias antibióticas do tipo da penicilina, o *P. notatum* cultivado em condições apropriadas produz uma ou mais substâncias tóxicas que exercem efeito antineoplásico demonstravel *in vitro*.

Quais sejam essas substâncias, se são tóxicas para células normais, e se seu efeito também se manifesta mediante tratamento de tumores *in vivo*, são questões às quais no momento ainda não temos elementos para responder.

INDICATION OF THE PRESENCE OF AN ANTI-NEOPLASTIC SUBSTANCE IN LIQUID MEDIA IN WHICH "PENICILLIUM NOTATUM" WAS ALLOWED TO GROW.

Abstract

This paper deals with a series of experiments concerning an anticarcinomatous property developed by Czapek--Dox medium in which Penicillium notatum was cultivated. This property

was demonstrated in vitro with small pieces having 3-5 mm in diameter of a transplantable tumor of mice. One hundred percent of tumor pieces treated under ice box temperature by this medium during 72 hours failed to develop new tumors when inoculated in susceptible mice, while one hundred percent of control pieces of the same tumors treated by Tyrode solution under the same conditions resulted in tumors, after their inoculation. This action was not due to pure culture medium neither to penicillin as procured in commercial form.

The media were one hundred percent active from the tenth to the fifteenth day of culture and partially active two days before or one month after this period.

This anticarcinomatous action was maintained after the active media were submitted to a temperature of 100° C during 30 to 45 minutes.

BIBLIOGRAFIA

1 — CORNMAN, J. — 1944 — Survival of normal cells in penicillin solutions lethal to Malignant cells. *Science*, 99: 247-248.

2 — LEWIS, M. R. — 1944 — The faillure of purified penicillin to retard the growth of grafts of sarcoma in mice. *Science*, 101: 314-315.

3 — MEYER, J. R. — 1942 — Estudos feitos com um segundo adenocarcinoma transplantavel do camondongo, encontrado no Instituto Biológico. *Arq. do Instituto Biológico*, S. Paulo, 13: 1927-136.

———o———

Vol. 16 — Art. 22 Dezembro de 1945

OBSERVAÇÕES SOBRE PROTOZOÁRIOS INTESTINAIS HUMANOS EM UMA ZONA RURAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

POR

N. G. Planet, R. Cuocolo e W. F. de Almeida

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Este trabalho faz parte de uma série de investigações que realizamos no distrito de Ibití (*), em princípios de 1943, com o intento de estabelecer as condições médico-sanitárias de sua população. Tais estudos, por sua vez, têm por fim completar um trabalho mais amplo planejado pelo Dr. J. DE PAIVA CASTRO, Diretor Geral da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, que consiste na análise mais completa possivel de uma unidade rural, representativa de uma determinada zona de nosso território. Tais estudos acham-se quasi completos e em vias de publicação.

No decurso de nossas observações realizamos grande número de exames de fezes, com o fim de verificar as possiveis infestações por helmintos e protozoários nos habitantes da região. No presente trabalho analisaremos somente os dados relativos aos protozoários intestinais.

Agradecemos ao Dr. CLEMENTE PEREIRA as contribuições valiosas na parte de exame do material e orientação geral do trabalho, e ao Sr. PAULO EMILIO VANZOLINI a orientação na parte de estatística.

CONDIÇÕES DE TRABALHO, MATERIAL E MÉTODO

A maior parte dos exames de fezes foi realizada em três fazendas — Santa Izabel, Bom Jesus e Salto Grande — próximas à cidade, em laboratórios de emergência.

As latinhas para a coleta de material eram distribuidas a todos os moradores, com instruções precisas quanto ao modo de usá-las e com a recomendação de que fossem reenviadas ao laboratório no mais breve prazo possivel, após a exoneração intestinal. Desta maneira, procuramos garantir o exame de fezes nas melhores condições possiveis.

De cada indivíduo examinado foi feita uma ficha com as indicações mais importantes, na qual era anotada qualquer referência especial ao seu estado de saude.

(*) Ex-distrito de Monte Alegre, Comarca de Amparo, Estado de São Paulo.

Examinamos cerca de 10% da população.

Para a pesquisa de protozoários eram preparadas duas lâminas com o material diluido em solução fisiológica, sendo adicionado lugol a uma delas; a outra porção das fezes era utilizada para a pesquisa de helmintos pelo método de Willis: concentração e flutuação em solução saturada de NaCl.

Queremos assinalar que a divisão arbitrária que estabelecemos relativamente às idades pareceu-nos a mais aconselhavel, por corresponder a períodos bem diferenciados; crianças de colo: menores de 1 ano; as que começam a andar: 1 a 2 anos; as de idade pré-escolar: 3 a 7 anos; as de idade escolar: 8 a 12 anos; os adolescentes: 13 a 18 anos; os adultos jovens: 19 a 25 anos; os adultos: 26 a 40 anos, e os indivíduos de meia idade e os velhos: maiores de 40 anos.

Tambem queremos ressaltar que os dados obtidos foram submetidos à análise estatística afim de termos uma idéia mais precisa da significação das proporções observadas; foram executados testes de χ^2 para verificação da significância das diversas diferenças entre proporções, isto é, testes de independência. Nos casos de apenas um grau de liberdade: tabelas 2x2, como por exemplo nas comparações entre adultos e crianças, parasitados e não parasitados, efetuamos sempre a correção de Yates para continuidade, o que consiste em somar ½ aos valores menores que a frequência teórica e subtrair ½, aos maiores. Nossas análises estatísticas foram feitas de acôrdo com R. A. FISHER (1934): "Statistical methods for research workers".

RESULTADOS

Os resultados obtidos pelo exame de fezes de 889 indivíduos acham-se sumariados nas tabelas 1 a 3 e nos gráficos I a IV.

Os resultados de inquéritos realizados no Brasil sôbre protozoários intestinais estão dispostos na tabela 4, sob a forma de porcentagens em relação ao total de indivíduos examinados.

A p o p u l a ç ã o examinada variou muito de autor para autor: uns basearam seus dados em exames de indivíduos que procuraram hospitais ou centros de saude, acusando perturbações intestinais ou com mau estado geral; outros referem resultados de exames coprológicos realizados tanto em pessoas sãs como em indivíduos com perturbações intestinais; terceiros examinaram colegiais, geralmente sem perturbações intestinais; foram tambem examinados indivíduos de zonas suburbanas e rurais, corpos de tropa, presidiários, etc. Entretanto um exame sistematizado de população rural parece não ter sido anteriormente executado entre nós. G. PACHECO (1928) e A. D. F. DO

AMARAL (1942) foram os que trabalharam com material mais semelhante ao nosso, pois examinaram amostras de fezes de indivíduos de zonas rurais, preocupando-se, porém, exclusivamente com a pesquisa de cistos de *Entamoeba histolytica*, nada referindo a respeito dos demais protozoários intestinais.

Quanto às técnicas de exame, a maioria dos autores tem empregado o exame direto a fresco e tambem com coloração pelo lugol; às vezes tambem têm sido examinados esfregaços corados pela hematoxilina férrica. S. B. PESSOA e C. CORRÊA (1927), alem do exame direto, empregaram a centrifugação após tratamento pelo eter, processo que, segundo os autores, encontra-se no livro de C. DOBELL (1919); entretanto não conseguimos encontrar referência a tal método no livro em questão, mas sim em C. DOBELL e F. W. O'CONNOR (1921); estes autores citam a técnica original de J. W. CROPPER e R. W. H. ROW (1917), fazendo porem restrições às vantagens de seu uso. A. D. F. DO AMARAL e C. D. DE A. PIRES (1942), A. D. F. DO AMARAL (1942), M. O. A. CORRÊA e A. DE E. TAUNAY (1943) e A. L. AYROZA GALVÃO, L. M. FERREIRA e R. ALOE (1945), alem do exame direto, executaram a concentração dos cistos pelo processo de FAUST e col.: concentração e flutuação no sulfato de zinco. A. D. F. DO AMARAL e C. D. DE A. PIRES (1942), A. D. F. DO AMARAL e R. A. LEAL (1943) e A. D. F. DO AMARAL, C. D. DE A. PIRES e J. F. PONTES *in* A. L. AYROZA GALVÃO, L. M. FERREIRA e R. ALOE (1945) foram os únicos que fizeram exames repetidos pelo método de Faust, considerando como negativos apenas os que se comportavam como tal até o sexto exame; estes autores verificaram que com um único exame são diagnosticados praticamente 50% dos indivíduos positivos.

RIZÓPODOS

Entamoeba histolytica — Os autores que têm apresentado dados a seu respeito, em nosso meio, assinalam-na em porcentagens que variam entre 0,07 e 48% dos indivíduos examinados. Nós a encontramos apenas em 0,8% dos exames realizados.

Estas diferenças de índices de infestação podem ser devidas ao tipo de população, que variou bastante de autor para autor, tendo sido examinados grupos de indivíduos, suspeitos ou não, de zonas rurais ou de cidades. Tambem a técnica de exame pode ser responsavel, em parte, por essa variação.

Outro fator que pode tambem ter influido é o dependente do próprio microscopista, pois o diagnóstico de trofozoitos e de cistos de *E. histolytica*, ao contrário do que se pensa comumente, é relati-

TABELA 1

Incidência de protozoários intestinais, de acôrdo com a idade e o sexo.
Ibití — 1943

	Idade em anos																Total	
	0 - 1		1 - 2		3 - 7		8 - 12		13 - 18		19 - 25		26 - 40		> 40			
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Entamoeba coli	0	0	1	1	7	11	10	21	9	11	4	4	10	8	8	8	49	64
Iodamoeba bütschlii	0	0	0	0	5	3	19	6	10	3	6	4	7	8	3	5	50	29
Giardia intestinalis	0	0	1	1	6	5	6	5	2	5	1	2	2	4	0	1	18	23
Endolimax nana	0	0	0	0	1	0	2	3	0	0	1	0	2	1	2	1	8	5
Trichomonas hominis . . .	0	0	0	0	2	3	2	0	1	0	0	1	0	0	0	1	5	5
Entamoeba histolytica . . .	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1	2	0	0	1	3	4
Chilomastix mesnili	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2	1	5	2
Balantidium coli	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Total de indivíduos parasitados por protozoários	0	0	2	2	19	20	36	33	19	17	12	11	19	19	12	13	119	115
Total de indivíduos examinados	4	4	18	16	68	72	135	106	66	54	61	42	67	76	58	42	477	412

TABELA 2

Número e porcentagem (*) de indivíduos parasitados por protozoários intestinais, segundo os grupos de idade.
Ibití — 1943

	Idade em anos																	
	0 - 1		1 - 2		3 - 7		8 - 12		13 - 18		19 - 25		26 - 40		> 40		Total	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Entamoeba coli	0	0	2	5,88	18	12,86	31	12,86	20	16,67	8	7,77	18	12,59	16	16,0	113	12,71
Iodamoeba bütschlii . . .	0	0	0	0	8	5,71	25	10,37	13	10,83	10	9,71	15	10,49	8	8,0	79	8,88
Giardia intestinalis . . .	0	0	2	5,88	12	8,57	11	4,58	7	5,83	3	2,91	6	4,20	1	1,0	42	4,72
Endolimax nana	0	0	0	0	1	0,71	5	2,07	0	0	1	0,97	3	2,10	3	3,0	13	1,46
Trichomonas hominis . .	0	0	0	0	5	3,57	2	0,83	1	0,83	1	0,97	0	0	1	1,0	10	1,12
Entamoeba histolytica . .	0	0	0	0	0	0	3	1,24	0	0	1	0,97	2	1,40	1	1,0	7	0,78
Chilomastix mesnili . . .	0	0	0	0	2	1,43	1	0,41	0	0	1	0,97	0	0	3	3,0	7	0,78
Balantidium coli	0	0	0	0	0	0	1	0,41	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,11
Indivíduos examinados . .	8		34		140		241		120		103		143		100		889	

(*) % sôbre o total de indivíduos examinados, em cada grupo de idade.

TABELA 3

Incidência de protozooses de acôrdo com a idade e o sexo.
Ibití — 1943

Idade em anos	Indivíduos examinados			Indivíduos positivos para protozoários					
	Homens	Mulheres	Total	Homens		Mulheres		Total	
				n.º abs.	% Sôbre o total	n.º abs.	% Sôbre o total	n.º abs.	% Sôbre o total
0 - 1	4	4	8	0	0	0	0	0	0
1 - 2	18	16	34	2	11,1	2	12,5	4	11,8
3 - 7	68	72	140	19	27,9	20	27,8	39	27,9
8 - 12 . . .	135	106	241	36	26,7	33	31,1	69	28,6
13 - 18 . . .	66	54	120	19	28,8	17	31,5	36	30,0
19 - 25 . . .	61	42	103	12	16,7	11	26,2	23	22,3
26 - 40 . . .	67	76	143	19	28,4	19	25,0	38	26,6
> 40 . . .	58	42	100	12	20,7	13	31,0	25	25,0
Total . . .	477	412	889	119	24,9	115	27,9	234	26,3

vamente dificil e um técnico menos avisado poderá facilmente equivocar-se, tomando como *E. histolytica* outras amebas, principalmente cistos tetranucleados de *E. coli*, ou mesmo certas formas de *Blastocystis* e talvez tambem leucócitos e certos detritos fecais. Para serem evitados erros desta natureza, os exames deveriam ser feitos sempre pelo próprio protozoologista, condição rigorosamente observada no presente trabalho.

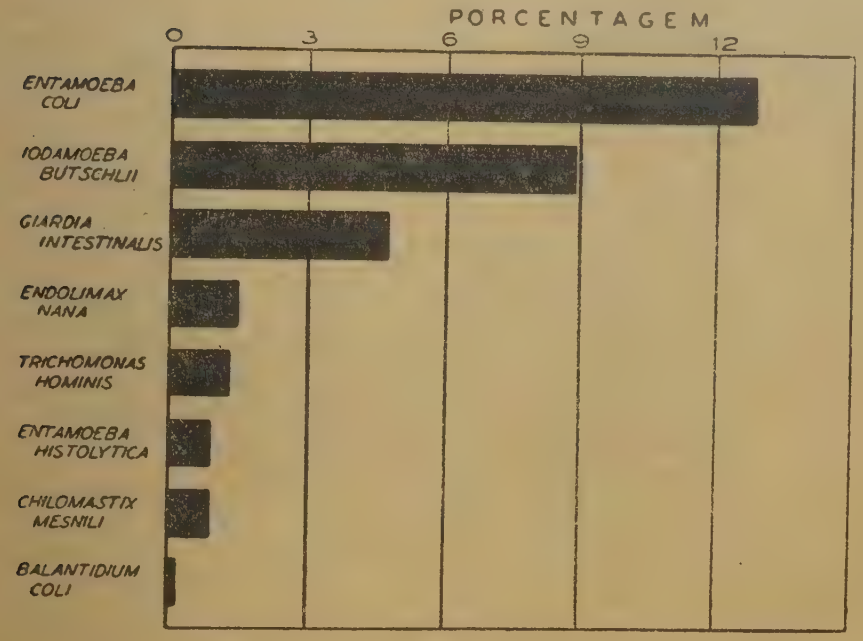
Segundo FAUST e col. (1939), o exame direto revela apenas cêrca da metade do que seria indicado pelo método de Faust, e de acôrdo com os trabalhos de A. D. F. DO AMARAL e col. (1942 e 1943), um único exame coprológico pelo método de Faust revela cêrca de 50% do total de portadores de *E. histolytica* na população estudada; portanto, para obtermos o total de positivos em uma população, o resultado do exame direto deveria ser quadruplicado. Efetuada esta correção, a porcentagem de portadores de *E. histolytica* na população estudada subirá a 3,1%, o que é ainda uma cifra bastante baixa, em relação às obtidas por alguns outros autores.

Quanto à patogenicidade da *E. histolytica*, assinalamos que, nos 5 casos por nós observados, apenas um apresentava história clínica passivel de ser filiada à amebíase; assim mesmo, seria necessário ter-se efetuado um exame bacteriológico destas fezes, afim de se excluir a possibilidade de serem tais perturbações devidas a bactérias intestinais patogênicas.

GRÁFICO I

FREQUÊNCIA DE PROTOZOÁRIOS INTESTINAIS

IBITÍ - 1943



Entamoeba coli — Nosso inquérito revelou-a em 12,7% dos indivíduos examinados, havendo sido esta a ameba mais frequente em nossos exames. Os dados obtidos pelos diferentes autores que trabalharam no Brasil neste assunto são, em geral, da mesma ordem de grandeza dos nossos; apenas C. J. YOUNG (1922), M. O. A. CORRÊA e A. DE E. TAUNAY (1943), A. D. F. DO AMARAL e R. A. LEAL (1944) e A. L. A. GALVÃO, L. M. FERREIRA e R. ALOE (1945) assinalaram valores muito mais altos. B. RANGEL PESTANA (1917) encontrou a *E. coli* apenas em 2,3% dos casos examinados.

Iodamoeba bütschlii — Por ordem de frequência, vem logo após a *E. coli*, tendo sido encontrada em 8,9% dos casos. As porcentagens referidas pelos diversos autores variam entre 0,5 e 14,2%.

Endolimax nana — Foi encontrada em 1,5% dos indivíduos examinados. As porcentagens assinaladas entre nós têm variado entre 0,1 e 2,4%.

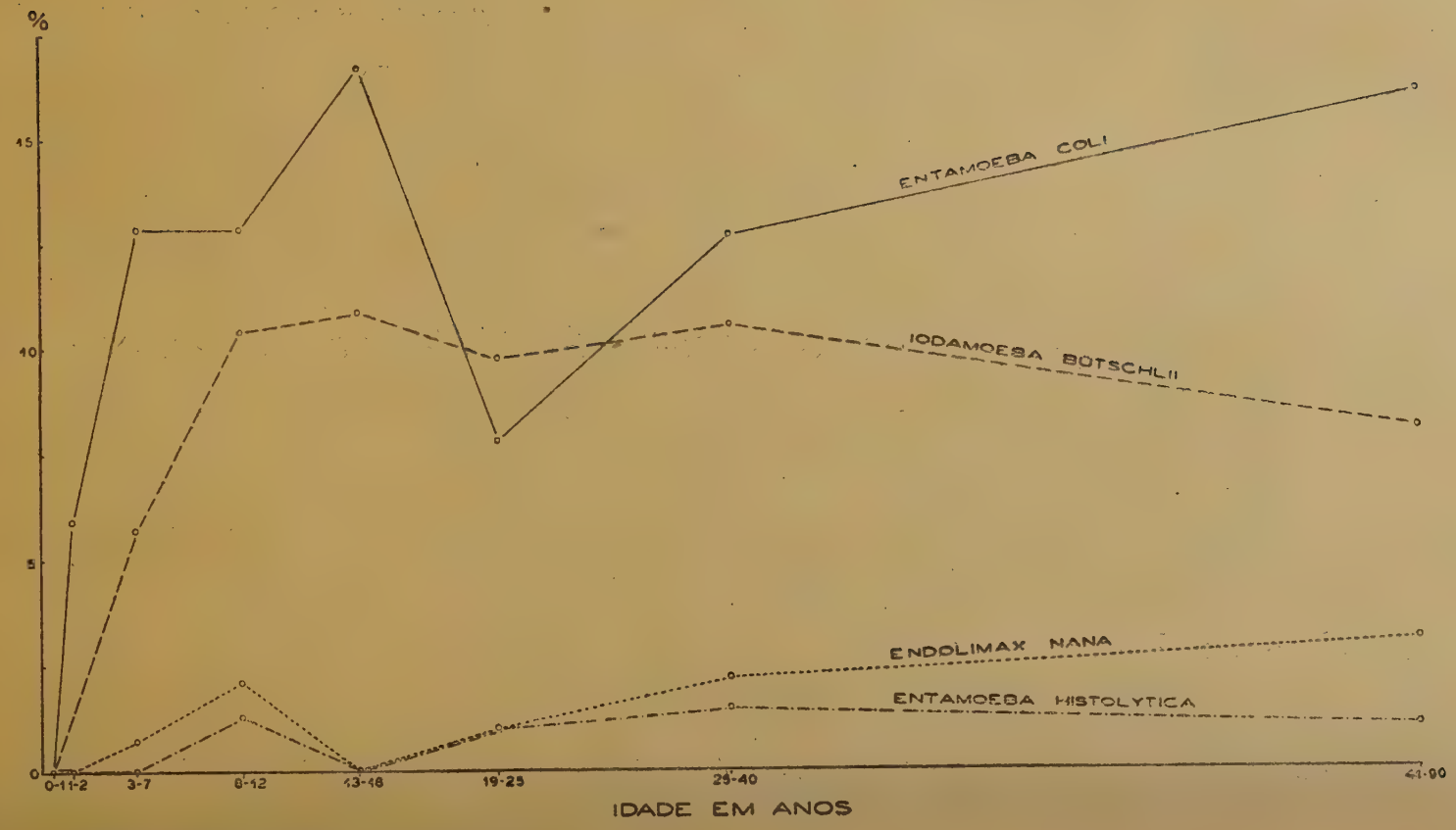
FLAGELADOS

Giardia intestinalis — Foi o flagelado mais comum nos exames por nós executados, tendo sido assinalada em 4,7% dos indivíduos. As

GRÁFICO II

FREQUÊNCIA DE AMEBAS INTESTINAIS, SEGUNDO A IDADE

IBITÍ – 1943



EXECUTADO COM OS DADOS DA TABELA 2

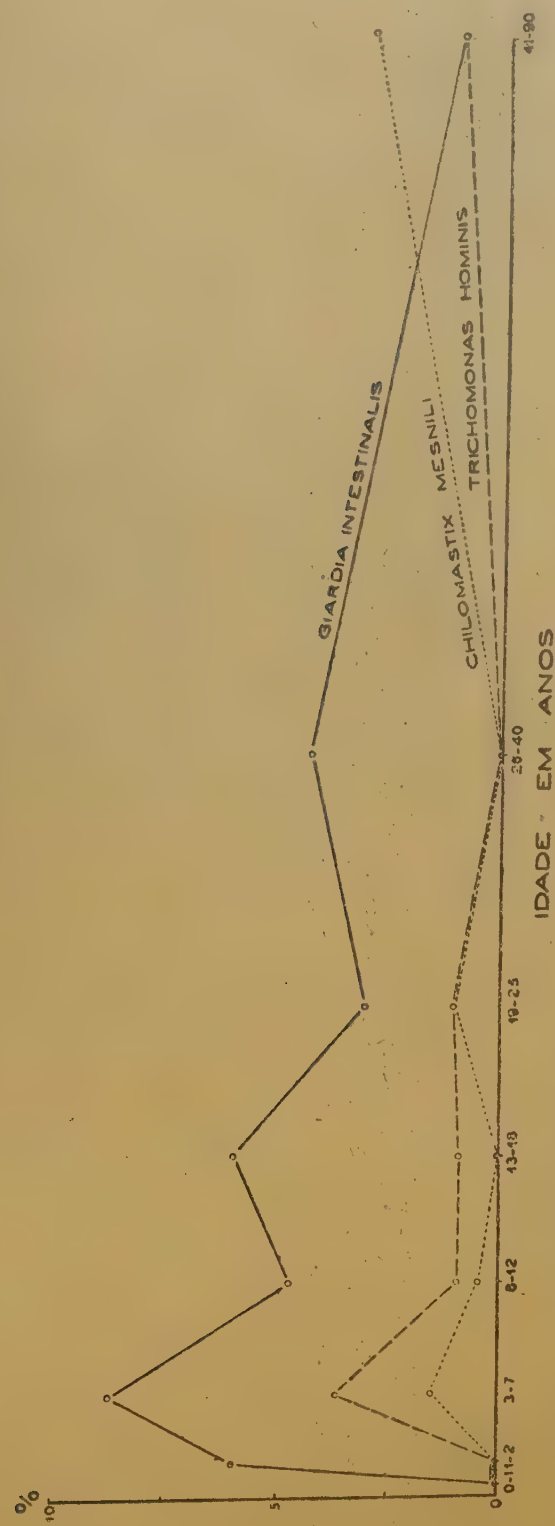
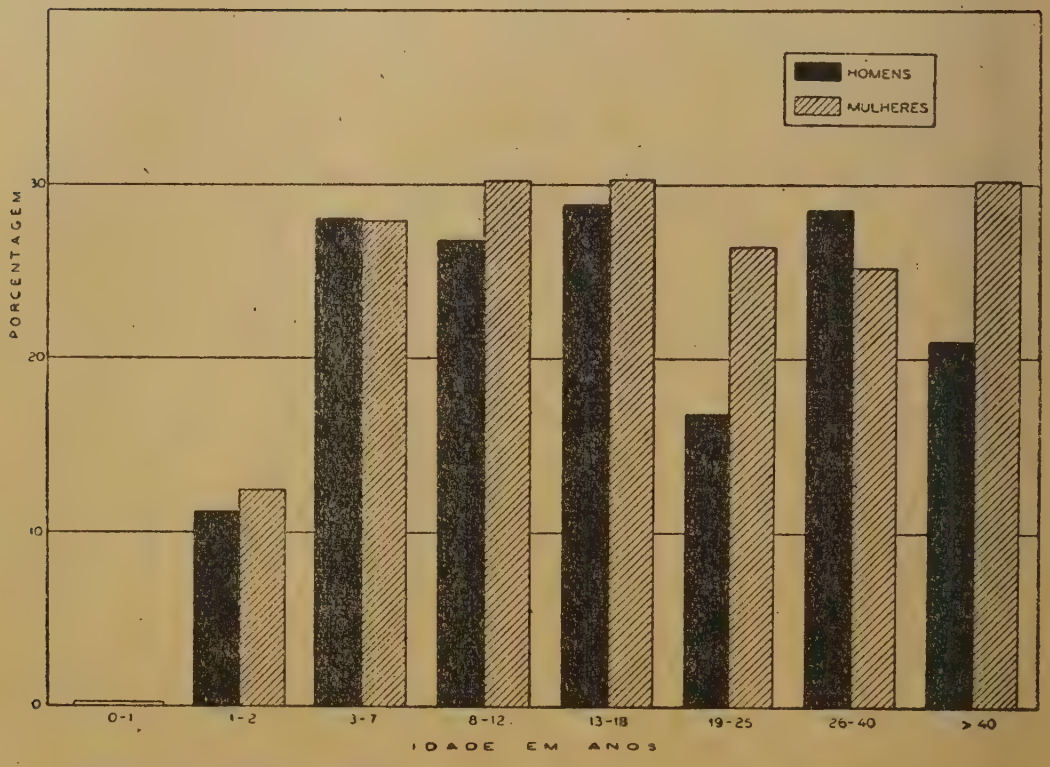


GRÁFICO III
FREQÜÊNCIA DE FLAGELADOS INTESTINAIS, SEGUNDO A IDADE
IBITÍ - 1943
GIARDIA INTESTINALIS
CHILOMASTIX MESNILI
TRICHOMONAS HOMINIS
%
10
5
0
0-1
1-2
3-7
8-12
13-18
19-25
26-40
41-90
IDADE EM ANOS
EXECUTADO COM OS DADOS DA TABELA 2

GRÁFICO IV

FREQUÊNCIA DE PROTOZOOSES INTESTINAIS. SEGUNDO A IDADE E O SEXO

IBITI - 1943



EXECUTADO COM OS DADOS DA TABELA 3

porcentagens encontradas pelos diversos autores têm variado entre 4,2 e 34,6%.

Trichomonas hominis — Ocorreu em 1,1% dos indivíduos examinados.

Chilomastix mesnili — Foi encontrado apenas em 0,8% dos exames.

As porcentagens referidas nos diversos inquéritos para estes dois últimos flagelados são, com raras exceções, da mesma ordem de grandeza.

Ciliados

Balantidium coli — Foi encontrado apenas em uma única criança, do sexo masculino, correspondendo, portanto, a 0,1%. Nos outros inquéritos sobre protozooses intestinais em nosso meio, suas porcentagens têm variado entre 0,05 e 0,15%.

TABELA 4

Frequência de protozoários intestinais no Brasil, segundo os vários autores.
(% em relação ao total de indivíduos examinados)

Autores	*Entamoeba histolytica*	*Entamoeba coli*	*Iodamoeba bütschlii*	*Endolimax nana*	*Giardia intestinalis*	*Trichomonas hominis*	*Chilomastix mesnili*	*Balantidium coli*	Total de indivíduos examinados	Observações	Estado e Cidade
M. Ficker (1915)	35*								260	Casos de disenteria	São Paulo (São Paulo)
T. Bayma (1917)	0,11								3.419	Vários laboratórios — 1912	" " " "
	0,88								3.495	" " — 1913	" " " "
	2,04								3.418	" " — 1914	" " " "
	8,52								4.717	" " — 1915	" " " "
	10,00								5.429	" " — 1916	" " " "
B. Rangel Pestana (1917)	9,0*	2,3*			4,2*	0,8*	3,6*		477	Indivíduos sãos e suspeitos (ex. direto e centrifugação)	" " " "
C. J. Young (1922)	27,5	38,6			8,3	0	4,4		251	Militares de tropas federais	Amazonas (Manaus)
	22,5	36,9			14,0	0	2,8		249	Crianças	" "
C. N. La Terza (1923)	5,26								475	Doentes	São Paulo (Santos)
S. B. Pessoa e C. Corrêa (1927)	16,7	16,7			20,8				216	Doentes e suspeitos (ex. direto e concentração)	" " (São Paulo)
G. Pacheco (1928)	1,8								220	Indivíduos de zonas suburbanas e rurais (ex. direto)	Rio de Janeiro (D. F.)
A. Marques da Cunha (1928)	0,87*	7,08	0,49	0,12	12,17	2,23	2,48	0,12	805	Crianças doentes (ex. direto)	" " " " "
F. B. Vieira e G. F. Silveira (1931)	34,0	18,8		0,3	34,6	13,4	1,1		373	Suspeitos de amebíase (ex. direto e concentr.)	São Paulo (São Paulo)
V. Lara e P. E. Carvalho (1936)	0,55*				28,96*	3,28*	3,28*		183	Crianças de idade pré-escolar (ex. direto)	" " " "
	0				14,07*	3,33*	1,11*		270	Escolares (ex. direto)	" " " "
A. M. da Cunha *in* C. Pinto, (1938)	1,23*	5,49	0,54	0,09	9,70	1,58	1,38	0,07	4.038	Crianças doentes (ex. direto)	Rio de Janeiro (D. F.)
R. Muniz de Aragão (1938)	23,66*								710	Doentes (ex. direto)	Paraíba (João Pessoa)

* Dados calculados ou recalculados por nós.

(Conclue na página seguinte)

(Conclusão da página anterior)

Autores	*Entamoeba histolytica*	*Entamoeba coli*	*Iodamoeba bütschlii*	*Endolimax nana*	*Giardia intestinalis*	*Trichomonas hominis*	*Chilomastix mesnili*	*Balantidium coli*	Total de indivíduos examinados	Observações	Estado e Cidade
E. V. de Oliveira (1938) . .	48								100	Doentes	Rio Grande do Sul
R. Gomes de Moraes (1939) .	7,0	15,9	1,4	1,1	5,3		1,4		1.000	Colegiais sãos (ex. direto)	Santa Catarina (Florianópolis)
B. Nunan (1939)	34,9				14,6					Doentes (cêrca de 300)	Minas Gerais (Belo Horizonte)
J. R. Cançado (1940)	12,5	23,8	0,5	1,5	10,8	1,4	8,1	0,2	1.000	Doentes (ex. direto e concent.)	Minas Gerais
L. Renault e W. Versiani (1940)	8,33	16,43	2,20	6,08	9,40	2,06	2,31	0,15	6.000	Doentes (ex. direto)	Minas Gerais
O. Moreira e A. P. Viégas (1940)	5,60	8,95			5,25		0,85	0,05	2.000	Doentes (ex. direto)	Minas Gerais (Belo Horizonte)
V. F. Barcelos (1940)	19,8								121	Suspeitos e sãos	Rio de Janeiro (Ilha do Carvalho)
A. B. Costa *in* C. Pinto, (1941)	47,5								1.370	Suspeitos de amebíase	Rio Grande do Sul (Santa Maria)
D. Lucena (1941)	0,07*								1.449	Doentes (ex. direto)	Pernambuco (Recife)
A. D. F. Amaral e C. D. Avila Pires (1942)	39,3								300	Presidiários (6 ex. concentração — met. de Faust)	São Paulo (São Paulo)
A. D. F. Amaral (1942) . . .	16,0								400	Inquérito em uma população rural (1 ex. conc. met. Faust)	São Paulo (B. Antonina)
M. O. A. Corrêa e A. de E. Taunay (1943)	13,0	32,0	14,2	2,4	23,2	1,0	2,4		500	Escolares	São Paulo (São Paulo)
F. O. Quaglia (1943)	21,05	5,26			16,59	2,02			247	Doentes	São Paulo (Rio Preto)
A. D. F. Amaral e R. A. Leal (1943)	17,2	44,2	10,6	33,0	7,1		0,5		197	Soldados do Exército (6 ex. conc. — met. de Faust)	São Paulo (São Paulo)
A. L. Ayrosa Galvão, L. M. Ferreira e R. Aloe (1945) .	13,4	50,0	13,8	33,8	5,7				260	Soldados do Exército (1 ex. conc. — met. de Faust)	São Paulo (Duque de Caxias)
A. D. F. Amaral, C. D. de A. Pires e J. F. Pontes *in* A. L. A. Galvão, L. M. Ferreira e R. Aloe (1945)	36,17								600	Presidiários (6 ex. conc. — met. de Faust)	São Paulo (São Paulo)
Nossas observações	0,78	12,71	8,88	1,46	4,72	1,12	0,78	0,11	889	Inquérito em uma população rural (ex. direto)	São Paulo (Ibití)

* Dados calculados ou recalculados por nós.

INFLUÊNCIA DA IDADE

A tabela 3 e o gráfico III mostram que nos dois primeiros grupos de idade: 0 a 1 e 1 a 2 anos, as porcentagens de indivíduos parasitados são bem pequenas: 0% e 11,8%, respectivamente; já no terceiro grupo: 3 a 7 anos, encontramos cêrca de 25% de indivíduos parasitados, nivel mantido aproximadamente pelos demais grupos. Entretanto, efetuando neste material um teste de χ^2 para verificação da significância da diferença entre proporções (tabela 5), encontramos para χ^2 o valor de 8,7 que corresponde a uma probabilidade de cêrca de 0,20 de ser a diferença entre as proporções obra do acaso e não dependente realmente da idade do indivíduo.

TABELA 5

Teste de χ^2 para verificação da significância da diferença entre proporções de parasitados e não parasitados por protozoários, nos diferentes grupos de idade. Ibití — 1943

	Idade em anos							
	0-2	3-7	8-12	13-18	19-25	26-40	> 40	Total
Parasitados por protozoários	11,1/ 4	36,9/ 39	63,4/ 69	31,6/ 36	27,1/ 23	37,6/ 38	26,3/ 25	234
Não parasitados por protozoários	30,9/ 38	103,1/ 101	177,6/ 172	88,4/ 84	75,9/ 80	105,4/ 105	73,7/ 75	655
Total	42	140	241	120	103	143	100	889

$\chi^2 = 8,7$
para n = 6 : P = aprox. 0,20

Afim de examinar o problema da influência da idade em cada protozoose, separamos os indivíduos em dois grupos, considerando como crianças os indivíduos até 12 anos, e adultos os maiores de 12. Os testes de χ^2 executados revelaram sempre valores muito pequenos para χ^2; portanto, não significantes (tabela 6). Entretanto os gráficos II a IV parecem indicar uma incidência maior de protozooses na infância, mas isso é devido, provavelmente, a flutuações ocasionais da amostra.

No material com que trabalhamos foi, portanto, demonstrada a não influência da idade nas diferentes protozooses intestinais; entretanto alguns autores têm referido a existência de tal influência, como por exemplo, S. B. Pessoa e C. Corrêa (1927), V. Lara e P. E. de Carvalho (1936), F. B. Vieira e G. F. da Silveira (1931).

TABELA 6

Incidência de protozoários intestinais em crianças e adultos
Testes de χ^2 — Ibití — 1943

	Crianças (0 a 12 anos)		Adultos (> 12 anos)		χ^2	P (n = 1)	% de positivos sôbre o total	
	Paras.	Não paras.	Paras.	Não paras.			Crianças	Adultos
Protozoários em geral	112	311	122	344	0,03	0,80 — 0,90	26,5	26,2
Entamoeba coli	51	372	62	404	0,12	0,70 — 0,80	12,1	13,3
Iodamoeba bütschlii . .	33	390	46	420	0,85	0,30 — 0,50	7,8	9,9
Giardia intestinalis . .	24	399	17	449	1,63	aprox. 0,20	5,7	3,6
Endolimax nana	6	417	7	459	0,03	0,80 — 0,90	1,4	1,5
Trichomonas hominis .	7	416	3	463	1,23	0,20 — 0,30	1,7	0,6
Entamoeba histolytica.	3	420	4	462	0,02	0,80 — 0,90	0,7	0,9
Chilomastix mesnili . .	3	420	4	462	0,02	0,80 — 0,90	0,7	0,9
Balantidim coli	1	422	0	466	0,002	0,95 — 0,98	0,2	0

S. B. Pessoa e C. Corrêa (1927), trabalhando com indivíduos portadores de perturbações intestinais ou com mau estado geral, julgam haver maior infestação por protozoários na infância. Realmente, encontraram para os indivíduos de 0 a 15 anos a porcentagem de 52,3%, ao passo que os maiores de 15 anos apresentaram-se parasitados apenas em 34,9% dos casos. O teste de χ^2, executado nesse material (tabela 7), revelou para χ^2 o valor de 7,43, correspondendo a uma probabilidade menor que 0,01 de ser ocasional a diferença; portanto, há realmente influência da idade. Entretanto, afim de analisar melhor o problema, executamos testes semelhantes para cada espécie de protozoário separadamente e verificamos (tabela 7) que apenas há influência da idade para o caso da *Giardia intestinalis*.

TABELA 7

Incidência de protozoários intestinais em crianças e adultos
Dados de S. B. Pessoa e C. Corrêa (1927)
Testes de χ^2

	Crianças (0 a 12 anos)		Adultos (> 12 anos)		χ^2	P (n = 1)	% de positivos sôbre o total	
	Paras.	Não paras.	Paras.	Não paras.			Crianças	Adultos
Protozoários em geral	56	51	38	71	7,43	< 0,01	52,3	34,9
Entamoeba histolytica.	22	85	14	95	1,79	0,10 — 0,20	20,6	12,8
Entamoeba coli	19	88	17	92	0,06	aprox. 0,80	17,8	15,6
Giardia intestinalis . .	32	75	13	96	9,52	< 0,01	29,9	11,9

V. Lara e P. E. de Carvalho (1936), em crianças que frequentavam o Centro de Saude do Instituto de Higiene, concluem que a infestação por protozoários intestinais é muito maior entre os pré-escolares que entre os escolares. Realmente, encontraram 32,2% de pré-escolares parasitados por protozoários e apenas 15,6% de escolares parasitados. Efetuamos, tambem para este caso, um teste de χ^2 (tabela 8) e encontramos $\chi^2 = 16{,}61$, correspondendo a uma probabilidade menor que 0,01 de ser ocasional a diferença, isto é, há influência da idade. Executamos, então, testes semelhantes para cada espécie de protozoário, separadamente, afim de verificar qual ou quais os protozoários responsaveis por esta influência (tabela 8) e concluimos que apenas para o caso da *Giardia intestinalis* há influência da idade, sendo ocasionais as diferenças quanto às outras protozooses.

TABELA 8

Incidência de protozoários intestinais em pré-escolares e escolares
Dados de V. Lara e P. E. de Carvalho (1936)
Testes de χ^2

	Pré-escolares		Escolares		χ^2	P (n = 1)	% de positivos sôbre o total	
	Paras.	Não paras.	Paras.	Não paras.			Pré-escolares	Escolares
Protozoários em geral	59	124	42	228	16,61	< 0,01	32,2	15,6
Ameba	1	182	0	270	0,04	0,80 — 0,90	0,5	0
Trichomonas hominis .	6	177	9	261	0,56	0,30 — 0,50	3,3	3,3
Chilomastix mesnili . .	6	177	3	267	1,63	aprox. 0,20	3,3	1 1
Giardia intestinalis . .	53	130	38	232	14,12	< 0,01	29,0	14,1

TABELA 9

Escolares e *pré-escolares* parasitados por *Giardia intestinalis*.
Teste de χ^2 para verificação da significância das diferenças entre proporções.
Ibití — 1943

	N.º de indivíduos parasitados por *G. intestinalis*	N.º de indivíduos não parasitados por *G. intestinalis*	Total	% de positivos
Pré-escolares (0 a 8 anos) . .	13	169	182	7,1
Escolares (8 a 12 anos) . . .	11	230	241	4,6
Total	24	399	423	5,6

$\chi^2 = 3{,}24$
para n = 1, P : 0,05 — 0,10

Procuramos ver se se daria, com o nosso material, fato semelhante ao verificado no trabalho de V. LARA e P. E. DE CARVALHO (1936); para isso executamos um teste de χ^2 para verificação da significância das diferenças entre proporções de pré-escolares e de escolares parasitados por *Giardia* (tabela 9). Encontramos para χ^2 o valor de 3,24, correspondente a uma probabilidade entre 0,05 e 0,10 de ser a variação, ocasional, o que demonstra a não influência da idade quanto ao nosso material; no entanto esta pequena porcentagem de probabilidade encontrada mostra uma provavel tendência para maior infestação por *Giardia* nos indivíduos mais jovens.

F. B. VIEIRA e G. F. DA SILVEIRA (1931) julgam ser maiores as infestações por *Giardia intestinalis* e por *E. histolytica* no primeiro decênio da vida; de fato, para *E. histolytica* assinalam 38,6% no primeiro decênio e porcentagens que variam de 16,5% a 6,3%, nos decênios seguintes; para a *Giardia* referem 70,5% no primeiro decênio e porcentagens que variam de 11,6 a 0,8%, nos decênios seguintes. Entretanto estes autores deixam de assinalar quantos indivíduos examinaram em cada grupo de idade, o que não permite sejam feitos testes de verificação da significância das diferenças entre as proporções.

A. D. F. DO AMARAL e C. D. DE A. PIRES (1942) estudaram a distribuição de *E. histolytica* em relação à idade, à raça e à profissão, em adultos do sexo masculino internados na Penitenciária de São Paulo e verificaram maiores porcentagens respectivamente em indivíduos de 31 a 40 anos, em indivíduos da raça negra e em lavradores. Testes de χ^2 executados neste material (tabelas 10-A, 10-B e 10-C) revelaram probabilidades sempre acima de 0,05, indicando serem as variações provavelmente devidas a flutuações ocasionais da amostra. Entretanto os lavradores estão muito mais expostos à infestação pela *E. histolytica,* pois nas zonas rurais as condições higiênicas são precárias. O teste de χ^2 da tabela 10-C apresenta uma falha por ser muito pequena a frequência do grupo de "manipuladores de alimentos"; este teste só pode ser empregado com segurança nos casos em que a menor frequência teórica não seja menor que cinco e neste caso a menor frequência teórica é 3,5. Para evitarmos este inconveniente grupamos, de um lado, os lavradores e de outro, todos os indivíduos das demais profissões (tabela 10-D) e achamos para χ^2 o valor de 4,4, correspondente a probabilidades entre 0,02 e 0,05, portanto, dentro dos limites de significância: 0,01 a 0,05, demonstrando, possivelmente, serem os lavradores mais parasitados por *E. histolytica* que os indivíduos de outras profissões.

TABELA 10

Frequência de *E. histolytica* segundo a idade, raça e profissão.
Dados de A. D. F. do Amaral e C. P. de A. Pires (1942)
Testes de χ^2

A	Idade em anos				
	20-30	31-40	41-50	+ de 50	Total
N.º de indiv. posit. para *E. histolytica*	60	35	21	2	118
N.º de indiv. negat. para *E. histolytica*	91	46	30	15	182
Total	151	81	51	17	300
% de positivos	39,73	43,21	41,18	11,76	

$\chi^2 = 5,9$ Para n = 3, P: 0,10-0,20

B	Raças			
	Branca	Parda	Negra	Total
N.º de indiv. posit. para *E. histolytica*	74	23	20	117
N.º de indiv. negat. para *E. histolytica*	129	35	18	182
Total	203	58	38	299
% de positivos	36,44	39,66	52,63	

$\chi^2 = 3,4$ Para n = 3, P: 0,30-0,50

NOTA: — Não é computado nesta tabela um único indivíduo da raça amarela.

C	Profissões				
	Lavradores	Operários artífices, etc.	Comerciários, f. públ., músicos, etc.	Manipuladores de alimentos	Total
N.º de indiv. posit. para *E. histolytica*	71	32	12	3	118
N.º de indiv. negat. para *E. histolytica*	86	62	28	6	182
Total	157	94	40	9	300
% de positivos	45,23	34,04	30,00	33,33	

$\chi^2 = 5,0$ Para n = 3, P: 0,10-0,20

D	Profissões		
	Lavradores	Outras profissões	Total
N.º de indiv. positivos para *E. histolytica*	71	47	118
N.º de indiv. negativos para *E. histolytica*	86	96	182
Total	157	143	300
% de positivos	45,2	32,9	

$\chi^2 = 4,4$ Para n = 1, P: 0,02-0,05

M. O. A. CORRÊA e A. DE E. TAUNAY (1943) não notaram influência da idade na infestação por protozoários intestinais entre escolares de São Paulo.

INFLUÊNCIA DO SEXO

Na população estudada verificamos a não influência do sexo na distribuição das infestações por protozoários intestinais (gráfico IV e tabela 3).

TABELA 11

Incidência de protozoários intestinais em relação ao sexo.
Testes de χ^2
Ibití — 1943

	Homens		Mulheres		χ^2	P (n = 1)	% de parasitados sôbre o total	
	Paras.	Não paras.	Paras.	Não paras.			Homens	Mulheres
Protozoários em geral .	119	358	115	297	2,43	0,10-0,20	24,9	27,9
Entamoeba coli	49	428	64	348	5,05	0 20-0,50	10,3	15,5
Iodamoeba bütschlii . .	50	427	29	383	2,83	0,05-0,10	10,5	7,0
Giardia intestinalis . .	18	459	23	389	2,20	0,10-0,20	3,8	5,6
Endolimax nana	8	469	5	407	0,09	0,70-0,80	1,7	1,2
Trichomonas hominis . . .	5	472	5	407	0,01	0,90-0,95	1,0	1,2
Entamoeba histolytica .	3	474	4	408	0,11	0,70-0,80	0,6	1,0
Chilomastix mesnili . .	5	472	2	410	0,32	0,50-0,70	1,0	0,5
Balantidium coli	1	476	0	412	1,00	0,30-0,50	0,2	0

TABELA 12

Incidência de protozooses intestinais quanto à idade e ao sexo.
Testes de χ^2
Ibití — 1943

Idade em anos	Homens		Mulheres		χ^2	P (n = 1)	% de parasitados sôbre o total	
	Paras.	Não paras.	Paras.	Não paras.			Homens	Mulheres
0 - 1	0	4	0	4	—	—	0	0
1 - 2	2	16	2	14	0,17	0,50-0,70	11,1	12,5
3 - 7	19	49	20	52	0,03	0,80-0,90	27,9	27,8
8 - 12	36	99	33	73	0,43	0,20-0,70	26,7	31,1
13 - 18	19	47	17	37	0,01	0,90-0,95	28,8	31,5
19 - 25	12	49	11	31	0,29	0,50-0,70	16,7	26,2
26 - 40	19	48	19	57	0,08	0,70-0,80	28,4	25,0
> 40	12	46	13	29	0,88	0,30-0,50	20,7	31,0
Total de indivíduos	119	358	115	297	2,43	0,10-0,20	24,9	27,9

Executamos testes de χ^2, quer considerando cada protozoose separadamente (tabela 11), quer considerando os grupos de idade (tabela 12). Em ambos os casos obtivemos, em geral, valores relativamente altos para χ^2, correspondentes a probabilidades elevadas de ser a distribuição em estudo, independente do sexo, o que era realmente de esperar.

Poucos autores se têm preocupado com a questão da influência do sexo nas protozooses intestinais, provavelmente por se esperar que não haja influência alguma, a não ser talvez em virtude de ocupações diferentes, sendo deixado aos homens o trabalho de campo, que os tornaria mais sujeitos às protozooses intestinais.

F. B. VIEIRA e G. F. DA SILVEIRA (1931) assinalam leve predominância do sexo masculino em relação à *E. histolytica* e à *Giardia intestinalis*; entretanto não é possivel saber si as diferenças entre as proporções referidas são significantes, porque os autores só assinalam o número de positivos e não o número total de observações em cada sexo e em cada grupo de idade; por isso, não é possivel aplicar a estes dados um teste de χ^2 como fizemos aos demais. M. O. A. CORRÊA e A. DE E. TAUNAY (1942) não encontraram diferenças significativas quanto ao sexo, nas diversas protozooses.

CONCLUSÕES

Em Ibití (*), Estado de São Paulo, foi feito pelos AA. um inquérito quanto às condições de saude dos trabalhadores rurais. Foram examinados clinicamente mais de mil indivíduos, tendo sido feitos 889 exames de fezes pelo método direto, a fresco e com coloração pelo lugol, alem dos exames repetidos para controle de tratamento.

Foi verificada uma baixa incidência de *Entamoeba histolytica*: 0,8% dos indivíduos examinados.

Dos cinco indivíduos positivos para *E. histolytica*, apenas um apresentava sintomas clínicos que poderiam ser relacionados com a amebíase; mas seria necessário ter-se efetuado um exame bacteriológico destas fezes, afim de se excluir a possibilidade de serem tais perturbações devidas a bactérias intestinais patogênicas.

As outras amebas intestinais foram encontradas nas seguintes proporções: *Entamoeba coli*, 12,7%; *Iodamoeba bütschlii*, 8,9%, e *Endolimax nana*, 1,5%.

(*) Antigamente denominado Monte Alegre.

Entre os flagelados intestinais, *Giardia intestinalis* foi encontrada em 4,7% dos indivíduos examinados, *Trichomonas hominis*, em 1,2% e *Chilomastix mesnili*, em 0,8%.

Em um único indivíduo foi encontrado *Balantidium coli*: 0,1%.

Foram feitas análises estatísticas afim de se verificar a significância das diferenças entre proporções de crianças e adultos e de homens e mulheres parasitados, demonstrando-se a não existência de diferenças significativas. As afirmações de alguns autores quanto a estas ou outras diferenças de distribuição não foram confirmadas pela análise estatística de seus dados, excepto no caso da *Giardia intestinalis*, onde foi notada uma ligeira tendência para maior infestação quanto menor a idade.

HUMAN INTESTINAL PROTOZOOSIS IN A RURAL AREA OF SÃO PAULO, BRAZIL

Abstract

A rural population — Ibití, São Paulo, Brazil — was examined for a survey of general health conditions. This paper deals only with the intestinal protozoa found in the examined people.

About 10 per cent of the whole population was observed and 889 direct coprological examinations made. The feces were emulsioned with saline, two slides being made and iodine solution added to one.

The observed frequency of the intestinal protozoa is summarized in table 4 comparatively with other works carried out in Brazil on the same subject. Attention is called to the low frequency of Entamoeba histolytica - 0,8% - in spite of the careful microscopical research.

With reference to the pathogenicity of E. histolytica, from the five positive individuals, only one showed clinical symptoms that might be related to amebiasis, but it would be necessary to make feces culture to remove the possibility of the pains being caused by pathogenic intestinal bacteria.

Statistical analyses have been carried out for verification of differences between proportions — tests of independence —, the χ^2 test being used. Between proportions of children and adults, or men and women parasited or not parasited with intestinal protozoa no significant differences have been found.

The claims of some previous authors about such and other differences of distribution have not been confirmed by the statistical analyses of their data, except for a slight tendency of Giardia to predominate in children.

BIBLIOGRAFIA

Amaral, A. D. F. do — 1942 — Nota sôbre a incidência de portadores de cistos de E. histolytica, numa comunidade rural. *Rev. de Medicina*, S. Paulo, 26 (106): 49-57.

Amaral, A. D. F. e R. A. Leal — 1943 — Nota sôbre a incidência de vermes e protozoários intestinais entre soldados do exército, com referência especial aos portadores de cistos de Endamoeba histolytica. *Rev. Clin. de São Paulo*, 13: 91-101.

Amaral, A. D. F. e C. D. de A. Pires — 1942 — Nota sôbre a incidência de portadores de cistos de Endamoeba histolytica. *O Hospital*, Rio de Janeiro, 22 (3): 111-135.

Aragão, R. M. de — 1938 — Febre tifóide, disenterias e difteria em João Pessoa. *Brasil-Médico*, 52: 1058-1063 e 1084-1087.

Ayroza Galvão, A. L., L. M. Ferreira e R. Aloe — 1945 — Observações sôbre parasitoses intestinais em soldados aquartelados em São Paulo. *An. Fac. Med. São Paulo*, 21 (no prelo).

Barcelos, V. de F. — 1940 — Um surto de disenteria amebiana na Ilha do Carvalho, em Neves. *Arq. Hig.*, Rio de Janeiro, 10: 109-126.

Bayma, T. — 1917 — Novas medicações da disenteria amébica. *An. Paul. de Med. e Cir.*, 8: 173-183.

Cançado, J. R. — 1940 — Estudo sôbre a frequência dos parasitas intestinais humanos. *Brasil-Médico*, 54: 551-558.

Corrêa, M. O. A. e A. de E. Taunay — 1943 — Incidência das verminoses e protozooses nos escolares da Capital. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 3 (2): 247-260.

Cunha, A. M. da — 1928 — Protozoários intestinais nas crianças do Rio de Janeiro. *Sciencia Medica*, 6 (3): 103-109.

Dobell, C. — 1919 — The amoebae living in man. J. Bale, Sons & Danielsson, Ltd., London, VI, 155 pp, V pls.

Dobell, C. e F. W. O'Connor — 1921 — The intestinal protozoa of man. J. Bale, Sons & Danielsson, Ltd., London, IX, 211 pp, VIII pls.

Faust, E. C., W. Sawitz, J. Tobie, V. Odom, C. Peres e D. R. Lincicome — 1939 — Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. *Jour. Paras.*, 25: 241-262.

Ficker, M. — 1915 — Sôbre a disenteria em São Paulo. *An. Paul. Med.* e *Cir.*, 5: 335-339.

Lara, V. e P. E. de Carvalho — 1936 — Frequência dos parasitas nas fezes das crianças do Centro de Saude do Instituto de Higiene. *São Paulo Médico*, 1 (5): 341-362 e (6): 435-472.

Lucena, D. — 1941 — Alguns dados sôbre as mais frequentes parasitoses intestinais em Pernambuco. *Medicina Acadêmica*, Recife, ano de 1941: 1-4.

MORAIS, R. G. DE — 1939 — Portadores de quistos de protozoários intestinais entre os escolares de Florianópolis — Santa Catarina — Brasil. *Brasil Cir.*, 1 (3): 257-263.

MOREIRA, O. e A. P. VIÉGAS — 1940 — Contribuição ao estudo das parasitoses em Belo Horizonte. *Minas Médica*, 7: 411-414.

NUNAN, B. — 1939 — Contribuição ao tratamento da amebose intestinal infantil. *Minas Médica*, 6: 146-156.

OLIVEIRA, E. V. DE — 1938 — Estudo crítico da amebíase. *O Hospital*, Rio de Janeiro, 13: 93-111.

PACHECO, G. — 1928 — Sur la fréquence des kistes d'amibes et d'autres protozoaires dans des fèces apparemment normales, provenant des zones suburbaines et rurales de Rio de Janeiro. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 98: 1560-1561.

PESSOA, S. B. e C. CORRÊA — 1927 — Considerações acerca de alguns protozoários encontrados nas fezes do homem em São Paulo. *Folha Médica*, Rio de Janeiro, 8: 85-87.

PINTO, C. — 1941 — Pesquisas sôbre parasitologia humana e animal no Rio Grande do Sul. *Arq. Dept. Est. Saude, R. G. Sul*, 2, 73-91.

PINTO, C. — 1941 — Zooparasitos de interesse médico e veterinário. Ed. Pimenta de Mello & Cia., Rio de Janeiro, VII + 381 pg.

PLANET, N. G., R. CUOCOLO e W. F. DE ALMEIDA — 1945 — Experiências de tratamento das verminoses humanas com a fenotiazina. *Rev. Bras. Med.*, 2 (2): 105-110.

QUAGLIA, F. O. — 1943 — Alguns dados estatísticos sôbre 277 exames de fezes. *Bol. Soc. Med. e Cir. de Rio Preto*, 9-16 (anos de 1934 a 1943): 5-11.

RANGEL PESTANA, B. — 1917 — Considerações acerca de alguns protozoários e outros parasitos encontrados em fezes humanas. *An. Paul. Med. e Cir.*, 8 (5): 101-113.

RENAULT, L. e W. VERSIANI — 1940 — Parasitismo humano por helmintos e protozoários em Belo Horizonte. *Brasil Médico*, 54: 487-492.

TERZA, C. N. LA — 1923 — Contribuição ao estudo da disenteria amebiana em Santos. *Bol. Soc. Med. e Cir. de Santos*, 1 (1): 80-97.

VIEIRA, F. B. e G. F. DA SILVEIRA — 1931 — Protozoários intestinais do homem na cidade de São Paulo. *São Paulo Médico*, ano 3, vol. 2: 27-35.

YOUNG, C. J. — 1922 — Human intestinal protozoa in Amazonas. *An. Trop. Med. Paras.*, 16: (1): 93-98.

———o———

Vol. 16 — Art. 23 Dezembro de 1945

UMA NOVA ESPÉCIE DE "LISSORHOPTRUS LEC." (COL.-CURC.)

POR

G. Duval

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 6 figuras no texto e estampa 17

Os gorgulhos aquáticos, do gênero *Lissorhoptrus* LEC., constituem um grupo de curculionídeos prejudiciais à cultura do arroz irrigado. As espécies conhecidas têm larga distribuição geográfica nas Américas, ocorrendo *Lissorhoptrus simplex* (SAY, 1831) e *L. apiculatus* (GYLL., 1836) [duvidosa] nos EE. UU., Guatemala e Panamá(4); uma espécie provavelmente nova, na Guiana Inglesa(2); *L. oryzae* COSTA LIMA, 1936 no Brasil (Rio Grande do Sul)(1) e *L. bosqi* KUSCHEL, 1943 na Argentina (Entre Rios)(5).

A importância econômica dos "gorgulhos aquáticos do arroz" ("Rice Water Weevils") tem sido estudada nos EE. UU. por diversos pesquisadores, constituindo o trabalho de ISELY & SCHWARDT(3) um dos mais completos.

Em princípios de Abril de 1945, R. L. ARAUJO, do Instituto Biológico, recebeu do Agrônomo S. S. MELLO, material de arroz coletado no município de Vargem Grande (São Paulo), para identificação das larvas que estavam causando sérios prejuizos às mudas recenformadas de arroz irrigado, e graças à sua gentileza tivemos oportunidade de estudar os exemplares encontrados em 26 do mesmo mês. Posteriormente, constatou-se a existência da praga — importante para os arrozais irrigados e transplantados ou de muda — no município de Caçapava e, a seguir, em todos os outros do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo.

Lissorhoptrus foveolatus, n. sp.

Corpus oblongo- vale, squamis cereis totum vestitum; flavocinereum, maculo dorsali obscura ornatum. Rostrum validum, arcuatum. Antennae funiculo 6-articulato, clava laevi et nitida, elongata, apice tantum pubescente. Tarsi elongati, 4-articulati, IV articulo secundum et tertium conjunctim aequante; tibiae arcuatae, dente apicali valido armatae, intermediis duabus fimbriis natatoriis instructae, superiore longa et densa et inferiore breviore et sparsa; elytra postice in interstitiis alternis a primo incipiendo tuberculata et longitudinaliter medio depressa usque ad declivitatem. Ablatis squamis cereis, superficies videtur foveolis irregularibus cribrata a constrictione anteriore; elytra seriatim

foveolata, interstitiis elatis et trabeculis transversis ligatis, seriem fovearum longitudinalem fingentibus.

Corpo oblongo oval, completamente protegido por um revestimento impermeável de escamas cerosas justapostas; coloração geral côr de palha-cinza, com desenho dorsal escuro, às vezes mascarada pelo escurecimento geral do revestimento; antenas, tarsos e extremidades das tíbias castanho-ferruginosos claros; escrobos e ápice do rostro mais escuros. Desenho dorsal escuro, de sépia a preto, mais nítido com o inseto umidecido: no protorax, faixa longitudinal mediana, margens difusas, estreita no terço anterior e, depois, mais larga que o rostro, e nos élitros, semi-elipse voltada para trás, marginada por uma faixa côr de palha clara, interrompida na declividade, que lembra o desenho de um colarinho.

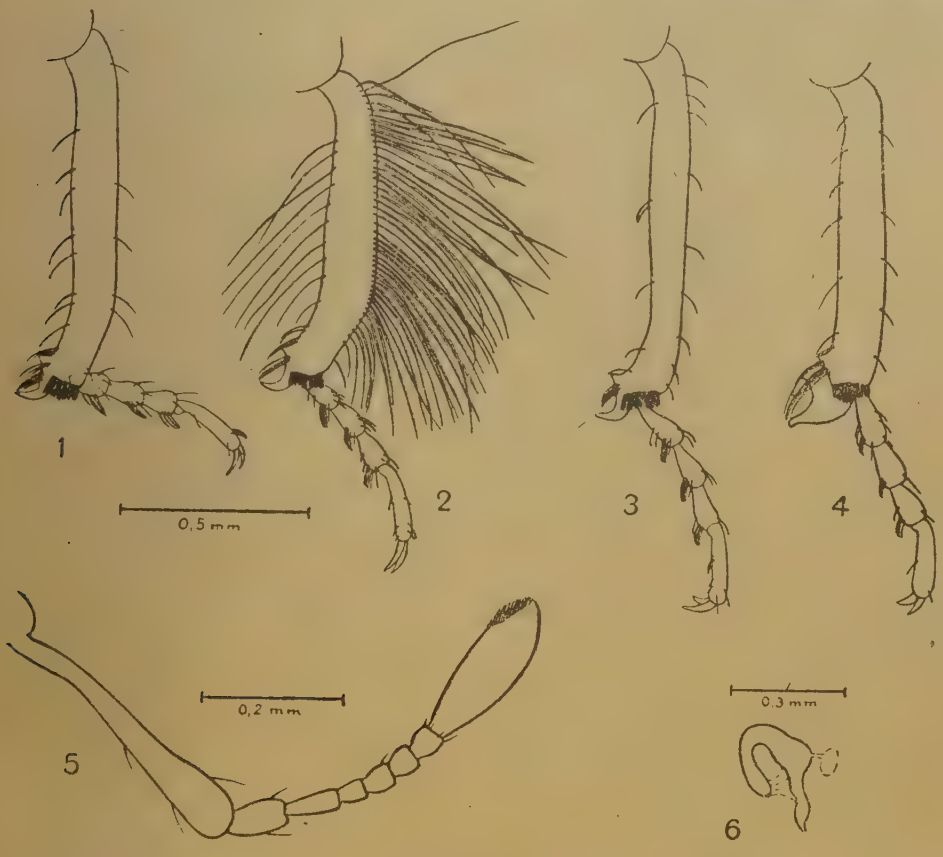
Cabeça: rostro forte, tão longo quanto o protorax, arqueado, margem superior convexa e inferior subretilínea, cilíndrico, visto de frente com ligeira dilatação apical; completamente revestido de escamas, com setas pálidas esparsas, mais numerosas na parte distal, superfície sem as escamas, finamente pontuada, à semelhança de dedal; escrobos lisos, deflexionados; olhos ovais, pretos brilhantes, pouco proeminentes, separados superior e inferiormente, parcialmente ocultos pelo lóbulo ocular do protorax. Antenas (Fig. 5) lisas e brilhantes, exceto a zona sensitiva apical, de pubescência sedosa, branca, e as setas pálidas, mui tênues, do escapo e artículos do funículo; escapo claviforme, não alcançando os olhos, revestido de cera na face externa; funículo de 6 artículos, 1.º grosso e globuloso, 2.º delgado, tão longo quanto 3.º-4.º juntos, 3.º-6.º sub-iguais, progressivamente aumentados de tamanho; clava oblonga, três vezes mais longa que larga, e tão longa quanto 2.º-6.º artículo do funículo juntos, zona sensitiva elítica, excêntrica e interna ao ápice, pequena em comparação com o resto da clava.

Protorax tão longo quanto largo, estrangulado anteriormente, ângulos laterais obtusos em forma de tubérculos rômbicos, pouco salientes e posteriores ao estrangulamento; lóbulos oculares pronunciados, inferiormente ligados em arco acentuado; revestimento ceroso uniformemente distribuido, mas, muitas vezes, com pequenas depressões desiguais, resultantes da sua acomodação à superficie quitinizada. Removido o revestimento ceroso, protorax castanho ferruginoso semiluzidio, com fóveas pequenas, irregulares, de paredes finamente pontuadas, desde o estrangulamento.

Élitros subparalelos, ombros salientes; fortemente atenuados na declividade, ápice deiscente; uma vez e meia mais longo que largo, vez e meia mais largo que o protorax; estrias nítidas, em linhas finas sulcadas no revestimento ceroso, intervalos convexos, muito largos; intervalos ímpares 1.º-7.º com tubérculos e setas decumbentes, estas visíveis desde a base e aquelas salientes apenas na declividade; depressão longitudinal mediana entre estrias 2.as, até a declividade. Pela adaptação do revestimento ceroso à estrutura seriado-foveolada dos élitros, os intervalos tornam-se filetes espessos, ligados por septos transversais, delimitando depressões em séries, pelas quais passam medianamente as estrias, interrompidas ou inconspícuas. Removido o revestimento ceroso, élitros seriado-foveolados, castanho-pretos semiluzidios, intervalos como filetes espessos, ligados por septos transversais formando séries de fóveas grandes, quadrangulares a hexagonais; intervalos 2.º e 3.º mais nítidos ao longo do élitro e mais elevados que os outros, notadamente nas proximidades da declividade;

intervalo e estria 1.os, formando depressão longitudinal até a declividade, nesta assumindo aspecto de carena; tubérculos sòmente na declividade, com setas pálidas decumbentes, nos intervalos ímpares e pouco proeminentes.

Pernas revestidas de escamas cerosas, côr de palha, superfície sem cera castanro ferruginosa clara, pontuada; coxas 1.º e 2.º pares contíguas; fêmures robustos, claviformes, com raras setas pálidas; tíbias arqueadas, com forte dente apical e outro diminuto, formando um crescente voltado para dentro,



Lissorhoptrus foveólatus, n. sp. Figs. 1-3 — tíbias e tarsos dos 1.º, 2.º e 3.º pares de pernas da fêmea; Fig. 4 — *id. ib.* do 3.º par do macho; Fig. 5 — antena; Fig. 6 — espermateca.

notavelmente maior nas tíbias posteriores dos machos (Figs. 1-4); setas esparsas, mais numerosas antes e entre os dentes, pente terminal de cerdas rijas do lado externo, tíbias intermediárias mais arqueadas, com duas franjas natatórias, a superior mais longa e densa, a inferior com cílios menores e mais esparsos, comumente coladas na cera em insetos sêcos; tarsos longos, castanho-ferruginosos claros, de 4 artículos, 1.º-3.º sub-iguais, com setas pálidas e longas na parte distal, 4.º delgado, tão longo quanto 2.º-3.º juntos; garras livres.

Face ventral revestida de cera côr de palha clara, aglutinada, sem escamas, exceto 5º esternito; prosternum plano; segmento abdominal 1.º mais largo que 2º, êste, mais do que 3º-4º juntos; 5.º subtrapezoidal, reves-

timento ceroso nas ♀ ♀ convexo ou plano, com pequena cavidade subhemisférica no ápice, e nos ♂ ♂ depressão semicônica, maior que a anterior, tendo a espessura da margem apical medianamente em forma de V muito aberto, e setas comumente aglutinadas nas suas extremidades; abdomen dos machos com segmento anal adicional.

Dimensões: long. 3,4-4,0 mm, lat. 1,4-1,8 mm.

Espécie afim de *L. bosqi* KUSCHEL, 1943, da qual se distingue, assim como de *L. simplex* (SAY, 1831) e *L. oryzae* COSTA LIMA, 1936, pela estrutura seriado-foveolada dos élitros.

Material examinado: 100 adultos (♀ ♀ e ♂ ♂) coletados em Caçapava, Estado de São Paulo, em 26 de Maio de 1945 por G. DUVAL e P. L. VIEIRA JR.

Cótipos: Coleção do Instituto Biológico, São Paulo, 60 exemplares; e doados ao Departamento de Zoologia de São Paulo; Instituto Oswaldo Cruz, Manguinhos, Rio de Janeiro; U. S. National Museum, Washington; e British Museum of Natural History, Londres; respectivamente 5 exemplares cada, sendo os restantes 20 exemplares conservados na coleção particular do autor.

Distribuição geográfica: Brasil, Estado de São Paulo, Vale do Paraíba. Levantamento procedido por P. L. VIEIRA JR. e G. DUVAL, (Secção Defesa Fitossanitária, Inst. Biol.) tendo sido constatada nos seguintes municípios: Jambeiro, São José dos Campos, Caçapava, Taubaté, Pindamonhangaba, Aparecida do Norte, Guaratinguetá, Lorena, Val Paraíba (ex-Cachoeira) e Cruzeiro, de 15.VI.45 a 21.VII.45, em sócas de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.).

O autor deseja expressar seus agradecimentos a R. L. ARAUJO, pela colaboração; ao mestre Prof. A. M. DA COSTA LIMA, pelo estímulo, auxílio e possibilidade de exame dos cótipos de *L. oryzae*, assim como de material de *L. simplex* a êle enviado pelo Dr. C. F. W. MUESEBECK, do U. S. National Museum; ao Revdo. Pe. G. KUSCHEL, pelo material de *L. bosqi*; à Srta. JUVENTINA DOS SANTOS, pelos desenhos, e a A. FEDERMAN, pelas fotografias.

A NEW SPECIES OF "LISSORHOPTRUS LEC." (COL.-CURC.)

Abstract

In this paper Lissorhoptrus foveolatus, n. sp. is described. This new rice water weevil was found in the "Vale do Paraíba", State of São Paulo, Brazil, as a pest of the flooded rice plantations.

BIBLIOGRAFIA

1 — Costa Lima, A. da — 1936 — Dois curculionideos daninhos no Rio Grande do Sul. *O Campo*, Rio de Janeiro, 7 (84): 23-24.

2 — Cleare Jr., L. D. — 1927 — Report on the Working of the Biological Division. *Rept. Dept. Sci. & Agr. Brit. Guiana 1926*, Georgetown, Appx. V. p. 64.

3 — Isely, D. & H. H. Schwardt — 1934 — The Rice Water Weevil. *Ark. Agr. Expt. Sta.* Bull. n.º 299. 44 pp.

4 — Klima, A. — 1934 — *Coleopterorum Catalogus*. Pars 140. Curculionidae: Erirrhininae, p. 106.

5 — Kuschel, G. — 1943 — Un "gorgojo acuático del arroz" argentino. *Notas del Museo de La Plata*, Buenos Aires, 8 (Zool., 71): 305-315.

———o———

EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA 17

Lissorhoptrus foveolatus, n. sp.

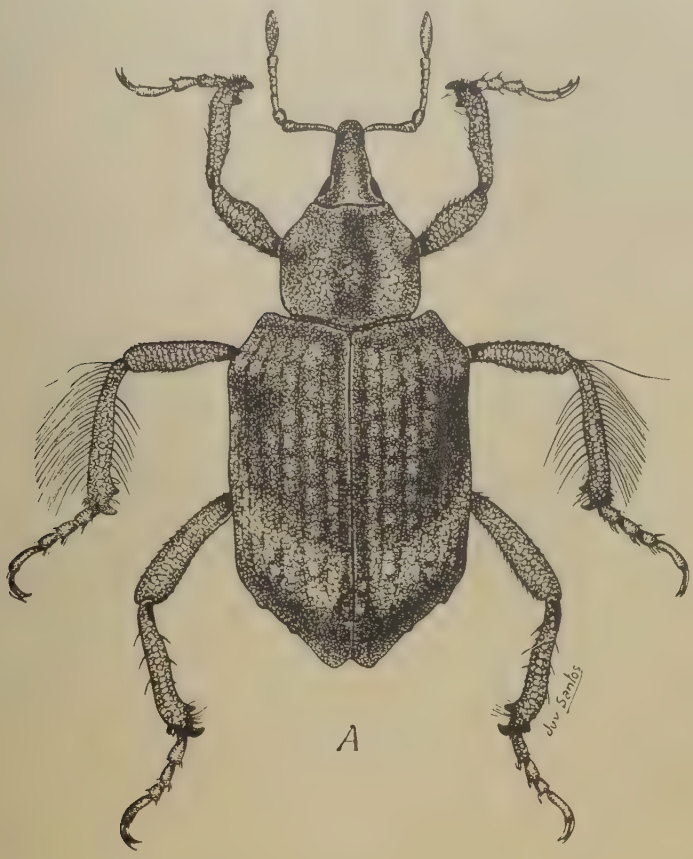
Fig. *A* — Desenho do gorgulho aquático do arroz, com o revestimento de escamas cerosas (× 15).

Fig. *B* — Foto, com o revestimento de escamas cerosas.

Fig. *C* — Exemplar limpo, mostrando a estrutura seriado-foveolada dos élitros.

(× 12. Federman, fot.)

———o———


A

B

C

Vol. 16 — Art. 24

Dezembro de 1945

CONSERVAÇÃO DO VALOR ANTIGENICO DAS VACINAS DE ENCEFALOMIELITE INFECCIOSA DO CAVALO

POR

V. Carneiro

Do Instituto Biologico de S. Paulo

O conhecimento preciso do tempo de conservação das vacinas sem perda do seu valor antigenico tem grande interesse experimental e aplicado, permitindo que não sejam fornecidas ao consumo partidas já destituidas do seu valor protetor. Do ponto de vista da produção industrial ha, ás veses, necessidade ou conveniencia de manter guardadas durante longos periodos, vacinas produzidas em grande escala, com o objetivo de solta-las quando a necessidade de aplicação surge, ás veses inesperada, diante de um surto epizoótico. E os surtos de encefalomielite infecciosa não obedecem a ondas periodicas fixas, mas podem surgir com intervalos maiores ou menores, o que nem sempre permite o escoamento rapido de um grande estoque comercial, preparado em uma mesma época

No caso especial das vacinas de encefalomielite equina, produto dotado de alto valor antigenico, mas cujo preparo completo é trabalhoso e longo, não podendo se comparar com a simplicidade e rapidez das tecnicas de muitas vacinas bacterianas, o interesse é assim muito maior em conhecer de modo mais exato o seu valor antigenico pela conservação na geladeira e á temperatura ambiente.

A literatura registra sobre o assunto alguns dados que passaremos em revista. Em seguida relataremos as experiencias que realizamos, mostrando a possibilidade de conservar durante longos periodos, muito acima dos até agora conhecidos, sem perda do seu valor antigenico, as partidas preparadas, embora com resultados irregulares no seu conjunto, que serão rapidamente analisados.

As primeiras experiências relativas ao praso de conservação na geladeira, feitas com cerebros virulentos, tratados pelo formol, mostram estabilidade do produto até 65 dias (3) e mesmo até sete meses (6). Com vacinas de embrião de pinto, SCHOENING (5) assinala valor protetor inalterado, pela conservação na geladeira, até pelo menos seis meses e em uma experiencia, até mesmo nove meses. Dados mais recentes assinadam valor protetor inalterado até dez e dose meses (1).

Á temperatura ambiente, em varias circunstancias, vacinas de um mês mostraram acentuada proteção, mas outras com o mesmo periodo, haviam perdido parcialmente o seu valor(5) e em vacinas de tres meses o poder antigenico está desaparecido. EICHHORN e WYCKOFF (4) assinalam que com seis meses de geladeira as vacinas ainda retêm completa proteção em todas as cobaias vacinadas e em face da prova de imunidade realisada por via cerebral. A 21°C. a conservação do valor antigenico alcança duas, tres semanas, ou mesmo um mês e na estufa, apenas tres dias.

Em trabalho anterior (2) assinalamos que vacinas conservadas até dez meses na geladeira a + 4°C. protegiam cobaias regularmente contra cerca de 1.000- 10.000 DLM cerebrais. Trabalhando com uma vacina do tipo venezuelano verificamos ainda que o seu valor antigenico solido se mostrava inalterado ao cabo de 22 meses de conservação na geladeira, quando inoculada na cobaia em duas doses de 0,5cc e 1cc respectivamente, e em face da prova de infecção realisada por via cerebral.

TECNICA DE TRABALHO

No curso de experiencias seriadas de imunidade tissular cruzada, para verificação da posição imunologica do virus brasileiro da encefalomielite equina que isolamos em S. Paulo, tivemos oportunidade de preparar vacinas de culturas de virus em embrião de pinto, inativadas pelo formol, dos tres tipos de virus, oeste, leste e venezuelano, e ainda de amostras diversas como a argentina, que pertence ao tipo oeste, e a brasileira que, de acordo com nossas experiencias anteriores, foi classificada como uma veriedade do tipo leste (2). Em seguida, em trabalhos de rotina, numerosas outras partidas foram preparadas, e quando dadas ao consumo, uma amostra era sempre retida e conservada na geladeira.

Em alguns anos de trabalho tinhamos reunido amostras de um grande numero de partidas, de edades diversas. Selecionamos para as experiencias aqui descritas as vacinas que satisfaziam ás seguintes condições:

1 — A DLM das culturas em embrião de pinto, dosada para verificação da concentração do virus, havia alcançado pelo menos, a diluição 10^{-7}, em inoculações intra-cerebrais em duas cobaias para cada diluição, ou em quatro camondongos albinos, nas doses de 0,1cc e 0,03cc respectivamente.

2 — As vacinas em experiencia tinham todas seu valor antigenico previamente verificado, logo depois de preparadas, de acordo com a rotina classica, de modo que em duas doses de 0,5cc cada uma, todas protegiam quatro cobaias vacinadas contra cerca de 1.000 DLM cerebrais de virus, isto é, contra as mesmas doses infectantes usadas agora, nestas experiencias.

TABELA 1

Conservação do valor antigenico das vacinas de encefalomielite equina mantidas por longos períodos na geladeira a + 4°C.

Vacina	Data Virus	Tempo de conservação meses	Vacinação cobaias	Prova de infecção	Resultado
1	3-9-41 A	42	94 2 doses de 0,5 cc com uma semana de intervalo 95 96 97	13-4-45, virus argentino a 1 p. 100	+ 4 d. Proteção + 4 d. nula + 4 d. + 4 d.
2	15-9-41 B	41½	98 2 doses de 0,5 cc com uma semana 99 100	2-4-45, virus brasileiro a 1 p. 10	morte acidental — —
3	18-9-42 A	30	102 2 doses de 0,5 cc 103 104 105	13-4-45, virus argentino a 1 p. 100	+ + Proteção + nula +
5	14-10-42 B	29	106 2 doses de 0,5 cc 107 108 109	2-4-45, virus brasileiro a 1 p. 10	— — Proteção — total —
Contrôles					
			228 229 230 231	2-4-45, virus brasileiro a 1 p. 10	+ + + +
			267 268 269 270	13-4-45, virus argentino a 1 p. 100	+ + + +

Legenda:
A — Amostra argentina
B — Amostra brasileira
O — Virus oeste
V — Virus venezuelano

TABELA 2

Conservação do valor antigênico das vacinas de encefalite equina na geladeira a + 4°C.

Vacina	Data Tipo	Tempo de conservação meses	Vacinação cobaias	Prova de infecção	Resultado	
7	4-12-42 O	27	110 2 doses de 111 0,5 cc com 112 uma sema- 113 na de in- tervalo	13-4-45, virus argentino a 1 p. 100	+ + + +	Proteção nula
9	2-7-43 B	20	114 2 doses de 115 0,5 cc 116 117	2-4-45, virus brasileiro a 1 p. 10	+ + + +	Proteção nula
16	8-11-43 B	19	401 2 doses de 402 0,5 cc 403 404	5-7-45, virus brasileiro a 1 p. 10	— — — —	Proteção total
10	26-8-43 B	18½	118 2 doses de 119 0,5 cc 120 121	2-4-45, virus brasileiro a 1 p. 10	— — — —	Proteção total
12	2-9-43 B	18½	122 2 doses de 123 0,5 cc 124 125	2-4-45, virus brasileiro a 1 p. 10	— — — —	Proteção total
			Contrôles			
			267	13-4-45, virus argentino a 1 p. 100	+	
			268		+	
			269		+	
			270		+	
			228	2-4-45, virus brasileiro a 1 p. 10	+	
			229		+	
			230		+	
			231		+	
			431	5-7-45, virus brasileiro a 1 p. 10	+	
			432		+	

Dispunhamos assim de 18 partidas de vacinas de encefalite equina conservadas na geladeira por um periodo que variou entre cinco meses e meio e quarenta e dois meses. Recentemente examinamos uma partida com cincoenta meses de geladeira, como se vê na tabela 5.

Cada partida é inoculada em quatro cobaias, em duas doses de 0.5cc por via subcutanea, em 7-3-45 e em 15-3-45. Apenas as vacinas de n.º 16 e de n.º 2 foram examinadas separadamente; a primeira dosada em julho de 1945 e a segunda redosada em novembro do mesmo ano.

As provas de resistencia cerebral das cobaias vacinadas, são realizadas entre 18 e 30 dias depois da segunda dose vacinante, sendo

TABELA 3

Contrôle do valor antigênico de vacinas de encefalite equina mantidas na geladeira a + 4ºC.

Vacina	Data tipo	Tempo de conservação em meses	Vacinação cobaias	Prova de infecção	Resultados	
13	16-9-43 B	18	126 duas doses 127 de 0,5 cc 128 129	4-4-45, virus brasileiro a 1 p. 10	+ + + —	Proteção muito má
14	23-9-43 B	17½	130 duas doses 131 de 0,5 cc 132 133	4-4-45, virus brasileiro a 1 p. 10	— — — —	Proteção total
15	8-10-43 B	17	134 duas doses 135 de 0,5 cc 136 137	4-4-45, virus brasileiro a 1 p. 10	— — — —	Proteção total
18	20-11-43 B	15	138 duas doses 139 de 0,5 cc 140 141	4-4-45, virus brasileiro a 1 p. 10	— — — —	Proteção total
			Contrôles			
			232 233 234 235	4-4-45, virus brasileiro a 1 p. 10	+ + + +	

TABELA 4

Contrôle do valor antigênico de vacinas de encefalite mantidas na geladeira a + 4°C.

Vacina	Data virus	Tempo de conservação em meses	Vacinação cobaias	Prova de infecção	Resultados	
19	31-3-44 V	11	142 duas doses 143 de 0,5 cc 144 145	14-4-45, virus venezuelano a 1 p. 100	— + + +	Proteção muito má
21	25-5-44 B	9	146 duas doses 147 de 0,5 cc 148 149	12-4-45, virus brasileiro a 1 p. 10	— — — —	Proteção total
22	15-6-44 O	8½	150 duas doses 151 de 0,5 cc 152 153	13-4-45, virus argentino a 1 p. 100	+ + + +	Proteção nula
23	20-7-44 B	7½	154 duas doses 155 de 0,5 cc 156 157	12-4-45, virus brasileiro a 1 p. 10	+ + ± (1) +	Proteção muito má
24	13-9-44 B	5½	158 duas doses 159 de 0,5 cc 160 161	12-4-45, virus brasileiro a 1 p. 10	— — — —	Proteção total
			Contrôles			
			275 276 277 278	14-4-45, virus venezuelano a 1 p. 100	+ + + +	
			263 264 265 266	12-4-45, virus brasileiro a 1 p. 10	+ + + +	
			267 268 269 270	13-4-45, virus argentino a 1 p. 100	+ + + +	

(1) Sintomas e cura.

TABELA 5

Nova dosagem do valor antigenico da vacina n.º 2, realisada 50 meses depois do seu preparo.

Vacina n.º 2 — Data do preparo: 15-9-941
Centrifugada a cerca de 3.500 r. p. m. durante 20 m. em 4-10-942.
Primeira dosagem na tabela 1.

Cobaias	Vacinação	Prova de imunidade	Resultados
799	1.ª dose: 8-11-45	26-11-45: 0.1cc por via	—
800	2.ª dose: 14-11-45, via	cerebral, de virus bra-	—
801	subcutanea	sileiro a 1 p. 10	—
802			—
Contrôles			
852		26-11-45: 0.1cc de virus	+
853		brasileiro a 1 p. 10	+
854			+
855			+

as doses infectantes as mesmas usadas em ensaios previos de rotina, isto é, emulsão de virus a 1p.10 no caso da amostra brasileira e a 1p.100 no caso do virus oeste e do venezuelano, doses que em ensaios anteriores mostraram-se satisfatorias. No momento de ser realizada a prova de infecção por via cerebral, a mesma dose de virus inoculada nas cobaias vacinadas, é inoculada em quatro cobaias não vacinadas, que funcionam como controles e que apresentam sintomas caracteristicos dentro do periodo de incubação normal e vêm a morrer.

As tabelas 1-2-3-4 e 5 resumem a sequencia das experiencias e os resultados obtidos, sendo as cobaias inoculadas por via cerebral observadas em seguida á inoculação, durante dez dias pelo menos. Na segunda coluna das tabelas figuram a data de preparo e o tipo de virus da vacina. Na terceira está o tempo de conservação na geladeira a + 4°C. Na quarta estão indicadas as vacinações. Na quinta está indicada a prova de resistencia cerebral realisada com cerca de 1.000-10.000 DLM, inoculadas sob a forma de sobrenadante de emulsão a 1p10 ou a 1p.100, de cerebro da cobaia em água fisiológica, emulsão centrifugada a 2.500 r.p.m. durante 10m. Na sexta coluna estão as indicações de morte ou sobrevivencia das cobaias inoculadas.

DISCUSSÃO

Os resultados destas experiencias, resumidos nas tabelas 1, 2, 3, 4 e 5, não são uniformes como se poderia esperar. Parece conveniente assinalar alguns exemplos nesse sentido, para examinar as causas provaveis das divergencias.

1 — Assim, temos na vacina n.º 1, da primeira tabela, uma vacina de virus argentino conservada durante 42 meses, que não oferece mais proteção contra cerca de 1.000 DLM cerebrais. Por outro lado, na vacina n.º 2 da mesma tabela, temos uma partida da amostra brasileira que, com um periodo de conservação mais ou menos identico, 41 meses e meio, oferece proteção solida em face de uma prova de infecção realizada com 1.000-10.000 DLM cerebrais, embora este resultado tenha ficado prejudicado pela morte acidental de duas cobaias, ocorrida antes de ser realizada a prova final. Mostra-o a experiencia da tabela 5, que é uma nova dosagem da mesma vacina.

Mais recentemente, realisamos uma nova experiencia isolada, verificando pela segunda vez, o valor antigenico desta mesma vacina n.º 2 do virus brasileiro, seguindo a mesma tecnica de vacinação em duas doses. A prova de infecção é realizada do mesmo modo, com sobrenadante de emulsão de virua a 1 p. 10, centrifugada rapidamente a baixa velocidade e é feita doze dias depois da segunda dose imunisante. Como se verifica pela tabela 5, o resultado é completamente satisfatorio. A vacina n.º 2 protege as quatro cobaias vacinadas, em contraste com a morte das quatro não vacinadas, que apresentam, tres dias depois, sintomas tipicos e morrem.

Considerando que esta vacina havia sido preparada em 15-9-41 e que a vacinação foi realizada em 8-11-45 e 14-11-45, verifica-se que temos ai uma vacina de poder antigenico solido e inalterado ao cabo de 50 meses de conservação na geladeira.

2 — Percorrendo as diversas tabelas, varios outros exemplos identicos ou mesmo mais nitidos, de irregularidades de resultados, podem ser encontrados. Ainda na tabela 1, ao lado de uma vacina com 30 meses de proteção nula, ha uma que por 29 meses conserva inalterado o seu solido poder antigenico; e ha outras em seguida, de 27 meses, de 20 meses, que não oferecem proteção. Nas tabelas 2 e 3, por outro lado, ha varias partidas de 18-19 meses e de valor antigenico inalterado.

Qual a explicação precisa para essas divergencias de resultados? Não estamos em condições de dize-lo, mas é possivel formular suposições ligadas a detalhes tecnicos de trabalho.

Não acreditamos que a concentração de virus nas diversas partidas possa explicar as diferenças de valor antigenico, pois ha aí relativa uniformidade e partidas de baixa concentração de virus não foram mesmo incluidas nestas experiencias, como assinalamos no inicio deste trabalho.

Haverá, talvez, detalhes na tecnica de preparo das vacinas e de sua conservação, cuja influencia convem assinalar. Assim, como essas diversas partidas serviram, com frequencia, a numerosas experiencias seriadas, eram elas muitas veses manipuladas no laboratorio, retiradas da geladeira, abertas para retiradas de pequenos volumes, mudadas de frasco, etc.; e parece assim provavel que fenomenos de oxidação se processem, explicando a queda ou o desaparecimento do valor antigenico. Alem disso, algumas partidas como esta, que forneceu resultado de mais longa conservação, foram centrifugadas a cerca de 3.000 r.p.m., durante cerca de 20m. no centrifugo de angulo, e outras foram apenas deixadas na geladeira, onde se processa uma lenta precipitação e deposição de particulas em suspensão. É possivel que o maior ou menor volumes de impuresas retidas na vacina tenha seu papel nocivo á estabilidade do antigeno formolado.

CONCLUSÃO

A conclusão de interesse pratico que se pode retirar destes ensaios, é que se pode conservar vacinas de encefalomielite equina durante longos periodos na geladeira, 18-20 meses, ou ainda 29-41 meses e mesmo até 50 meses, sem queda apreciavel do seu valor antigenico, em face das provas classicas e severas de dosagem do seu valor antigenico, por via intracerebral na cobaia.

Como, porem, o resultado de numerosas partidas aqui examinadas não são uniformes, toda vez que uma vacina tem um longo periodo de conservação, acima dos limites habituais, é conveniente, senão indispensavel, realizar uma nova dosagem do seu valor antigenico antes de entrega-la ao consumo. E' claro que se torna mais simples, mais rapido e menos dispendioso, principalmente em grandes volumes do produto, dosar de novo um estoque já preparado, do que preparar novas partidas.

A impressão que resulta do conjunto destes ensaios, é que se pode conservar durante longos periodos, até quatro anos, pelo menos, e mesmo mais, as vacinas formoladas de encefalite equina, sem queda de seu valor antigenico, em face de provas severas de dosagem, uma vez que os fatores de derioração sejam evitados, entre os quais pro-

vavelmente é importante a oxidação pela abertura repetida dos frascos. E' possivel que as impuresas em maior ou menor quantidade, conservadas no produto, tenham influencia nociva á estabilidade do antigeno formolado. Outras precauções habituais não devem ser desprezadas, como o uso de frascos bem fechados e de vidro neutro.

PRESERVATION OF THE ANTIGENIC VALUE OF EQUINE ENCEPHALOMYELITIS VACCINES

Abstract

Experiments on the preservation of the antigenic value of equine encephalomyelitis vaccines kept in ice-box proved that it is possible to preserve such vaccines up to 50 months without loss of their antigenic value, as per rigorous immunity tests performed by intracerebral route in guinea-pigs.

The results of numerous lots, however, are not regular and the factors which may be able to alter the antigenic value of the vaccines are discussed.

BIBLIOGRAFIA

1 — Anónimo — 1940 — Keeping qualities of encephalomyelitis vaccines. *Canadian J. Comp. Med.*, 2: 1. Analise in *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 96: 485.

2 — Carneiro, V. e R. Cunha — 1943 — Estudos sôbre a encefalomielite infecciosa dos equideos no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 14: 157-194.

3 — Cox, H. R. and P. K. Olitsky — 1936 — Active immunisation of guinea pigs with the virus of equine encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 63: 745-767.

4 — Eichhorn, A. and R. W. G. Wyckoff — 1938 — Immunological studies on equine encephalomyelitis. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 93: 285-290.

5 — Schoening, H. W. — 1938 — Equine encephalomyelitis. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 95: 268-272..

6 — Shahan, M. S. and L. T. Giltner — 1935 — Experimental studies on equine encephalomyelitis brain tissue vaccines. *The North Am. Vet.*, 16: 18-26.

———o———

DURAÇÃO DA IMUNIDADE NA ENCEFALOMIELITE INFECCIOSA DO CAVALO

POR

V. Carneiro

Do Instituto Biologico de S. Paulo

O estudo da duração da imunidade na encefalomielite infecciosa do cavalo tem sido realisado principalmente no camondongo suisso, em experiências seriadas, mais completas e de resultados em linhas gerais acordes, fornecidos por varios autores. No cavalo, apesar das dificuldades materiais de trabalhos em serie, experiências completas foram igualmente concluidas e os dados reunidos permitem um critério relativamente preciso sobre a epoca de revacinações. No homem as indicações são apenas indiretas. Na cobaia experiências foram igualmente realisadas, mas os dados relativos á longa duração da imunidade não são tão completos. Daí decorre o interesse das experiências aqui relatadas. Faremos de inicio, uma revisão dos dados reunidos pelos investigadores que se ocuparam do assunto nas diversas espécies.

*
* *

As primeiras indicações relativas á duração da imunidade na encefalomielite equina são de SHAHAN e GILTNER (15) em 1935, quando estudam as vacinações realisadas ainda com cerebros virulentos de cavalo, tratados pelo formol. Em experiências no cavalo, os autores assinalam que quando um alto grau de imunidade é obtido depois de seis semanas, há ainda evidencia de imunidade alguns mêses depois da vacinação.

COX e OLITSKY (5) em experiências na cobaia, assinalam que até três mêses depois da vacinação, a imunidade é ainda solida em face da prova de infecção por via cerebral. De três a sete mêses a imunidade já é um tanto reduzida quando provada por via cerebral, embora persista ainda solida quando provada por via subcutanea ou intranasal.

Com a introdução das vacinas formoladas de embrião de pinto as vacinações do cavalo se generalizaram rapidamente e surgiu a necessidade de conhecer melhor a duração da imunidade para fixar epoca de vacinações e de revacinações nas regiões assoladas pela doença. Como consequencia, em 1939, SCHOENING (13) realisa experiências no cavalo: nove animais são vacinados de acôrdo com técnica de rotina, isto é, com duas doses de 10 cc, com intervalo de uma semana, utilisando vacinas de tipo oeste. A imunidade é provada por via cerebral, com intervalos de 3 — 6 — 12 mêses, com tres testemunhas para cada experiência, que recebem virus nas mesmas doses e que apresentam prontamente um processo infeccioso especifico, seguido de morte. O resultado é o

seguinte: 1.º — com três mêses de vacinação, dois resistem e um morre de encefalite tipica; 2.º — com seis mêses, todos os três vacinados resistem; 3.º — com dose mêses, dois resistem e um morre.

O resultado indica, segundo SCHOENING, que mesmo um ano depois da vacinação, um alto grau de imunidade está presente.

Em 1943, SCHOENING, SHAHAN, GILTNER e OSTEEN (14), trabalhando com o tipo oeste, estudam comparativamente a duração da imunidade no cavalo, em vacinações realizadas por via subcutanea e intradermica. O resultado mostra que a imunidade no cavalo persiste em grau apreciavel até oito e mesmo até treze mêses. Ao cabo deste último periodo há no entanto indicações de que ela pode estar em declinio.

LYON e WYCKOFF (7) em 1938, assinalam com vacinas do tipo oeste, que uma imunidade solida persiste na cobaia, até seis mêses. Ainda na cobaia, SCHOENING (13) diz que experiências limitadas indicam uma imunidade real até nove mêses depois da vacinação. Todavia a imunidade produzida pelo tipo leste, depois dêsse periodo, não é tão completa quanto a produzida pelo oeste. Em trabalho anterior (2) assinalamos a maior dificuldade em proteger contra o mesmo tipo leste do que contra os outros dois tipos, mesmo usando vacinas de alta concentração de virus. O fato parece ligado ao maior poder infectante desse tipo, ou da amostra usada.

Estudos prévios de OLITSKY e MORGAN (11) e de MORGAN (8) demonstraram que a imunização suficientemente realizada, seja com virus ativo, seja com virus formolado, produz resistência cerebral identica e muito solida, até contra 10.000.000 de doses. MORGAN e OLITSKY (9) estudam em seguida a duração da imunidade no camondongo vacinado com virus ou com vacina, por um periodo de duas semanas a seis mêses e meio, e verificam nos dois casos: 1.º — com duas semanas, a resistência é muito solida; 2.º — com dois mêses, a resistência persiste, mas já não é tão solida; 3.º — com cerca de cinco mêses, a imunidade ainda é mais baixa; 4.º — com seis mêses e meio, a imunidade é apenas apreciavel.

Em 1943, CASALS (4) examina ainda no camondongo branco, a duração da imunidade comparada com o teor de anticorpos neutralisantes e de anticorpos fixadores do complemento, por um periodo de três a 121 dias, trabalhando com o tipo oeste. No terceiro dia nenhuma resistência é verificada; no nono dia a imunidade é bôa, no 16.º dia é muito solida, no 30.º dia é solida, no 58.º dia é negativa e no 121.º dia é baixa ou negativa. Conclue o autor que a resistência se instala entre 9 e 16 dias, alcança o máximo em 30 dias, e em torno de dois mêses decresce nitidamente.

No homem, a imunidade conferida pela vacina formolada e verificada pela presença de anticorpos neutralisantes no sôro sanguineo, único critério de trabalho possivel, alcança o máximo duas semanas depois e persiste até 6-9 mêses, conforme o tipo de virus (1).

* * *

Como se verifica por esta rapida análise dos dados reunidos pelos diversos autores, as experiências na cobaia são em número mais limitado, e mais completos os ensaios feitos no camondongo e

mesmo no cavalo. Além disso, a técnica de trabalho de imunisação e de infecção nem sempre é identica para permitir resultados comparáveis. Parece no entanto que no camondongo suisso a imunidade é de curta duração e que há largas variações de acôrdo com a espécie animal usada. Assim, no camondongo, ela alcança o máximo em cerca de duas semanas a um mês e já decresce em cerca de dois mêses. Na cobaia a duração de uma resistência solida já vai até três mêses, ou mesmo até a seis ou nove mêses, ou mais, como veremos. No cavalo a imunidade alcança nove mêses e mesmo um ano, embora não seja pratico realizar experiências em série, variando as doses infectantes e sondando o grau de resistência. Além disso, os ensaios em animais de laboratório são realizados em geral, por uma hiperimunisação, enquanto no cavalo são feitos visando uma imunidade contra infecção natural, isto é, com as duas doses classicas da rotina. A duração da imunidade parece ainda variar com o tipo de virus; o tipo leste, mais virulento, deixaria uma resistência especifica de menor duração que o oeste.

PARTE EXPERIMENTAL

Tivemos oportunidade de examinar a duração da imunidade na cobaia imunisada contra o virus brasileiro da encefalomielite equina isolado em S. Paulo em 1937, amostra que, conforme provas de imunidade cruzada descritas em trabalhos anteriores, (2-3) foi considerada uma variedade do virus leste. Os resultados dessas experiências são aqui relatados.

TÉCNICA — Na rotina de preparo de vacinas de encefalomielite equina, obtidas de culturas em embrião de pinto formoladas, o controle do valor antigenico das diversas partidas de vacina é regularmente realizado do seguinte modo: quatro cobaias são vacinadas com duas doses de 0,5 cc, por via subcutanea, e com intervalo de uma semana; cerca de duas semanas depois da segunda dose vacinante, a prova de resistência cerebral é realizada inoculando-se as cobaias vacinadas com 0,1 cc do sobrenadante de uma emulsão a 1 por 10, de cerebro de cobaia, centrifugada rapidamente, a 2.500 r.p.m. durante 10 minutos. A dose assim inoculada corresponde, conforme ensaios anteriores, a cerca de 1.000 — 10.000 DLM cerebrais para a cobaia. Cobaias assim imunisadas, que receberam duas doses de vacina por via subcutanea, quando recebem virus por via cerebral, resistem, em confronto com a morte dos controles.

Elas são em seguida conservadas no laboratório para estudo de duração da imunidade e novamente inoculadas por via cerebral ao cabo de seis mêses em uma primeira experiência, e ao cabo de dez mêses em um segundo ensaio. Dois lotes de cobaias assim solidamente imunisados recebem a mesma dose de virus, isto é, cerca de 1.000-10.000 DLM cerebrais.

Os resultados são os seguintes:

1.º — Com seis mêses de imunisação. Quatro cobaias solidamente imunisadas, que receberam duas doses de vacina por via subcutanea e virus por via cerebral, recebem de novo, seis mêses mais tarde, uma nova prova de infecção de virus a 1 p.10 por via cerebral. Simultaneamente, quatro cobaias não vacinadas recebem a mesma inoculação por via cerebral.

Resultado: As quatro cobaias vacinadas resistem, observadas durante longo periodo de mais de um mês; as quatro não vacinadas apresentam sintomas tipicos de encefalomielite no 3.º ou no 4.º dia de inoculação, e morrem dentro de 24-48 horas.

Verifica-se, assim, que as cobaias solidamente imunisadas, resistem seis mêses mais tarde á prova cerebral realizada com 1.000 DLM cerebrais pelo menos.

2.º — Experiência com dez mêses de imunisação — Um lote de 18 cobaias recebe em 14-10-43 e em 22-10-43 duas doses de 0,5cc de vacina de embrião de pinto formolada, de varias partidas, de alta concentração de virus. Em 6-11-43, isto é, 15 dias depois da segunda dose de vacina, as 18 cobaias recebem, por via cerebral, virus brasileiro a 1 p.10 de cerebro de cobaia. Todas resistem, observadas durante mais de 10 dias, em confronto com a morte de 4 cobaias não vacinadas, que revelam sintomas em 2½ - 3 dias, e morrem.

Assim solidamente imunisado, tendo recebido vacina por via subcutanea e virus por via cerebral, o lote de 18 cobaias é conservado no laboratório por um periodo de dez mêses. Algumas morrem acidentalmente durante esse longo periodo, e ao cabo de dez mêses o lote de cobaias está assim reduzido a 13. Estas são provadas de novo por via cerebral, para verificação de duração da imunidade.

A prova de resistência cerebral é realizada em 8-9-44 e consiste, do mesmo modo, na inoculação de 0,1cc de virus e 1 p. 10, sobrenadente de emulsão de cerebro de cobaia centrifugada a 2.500 r.p.m. durante 10 minutos. Quatro cobaias não vacinadas recebem a mesma dose de virus. Como ao cabo desse longo periodo de manutenção das cobaias no laboratório, as imunisadas são muito grandes, de 600-700 gr., e para fugir á possibilidade de uma maior resistência de cobaias nessas condições, os controles são escolhidos entre as do mesmo peso e idade.

Resultado: das 13 cobaias vacinadas apenas uma morre acidentalmente, no dia seguinte á inoculação cerebral, e 12 resistem, observadas durante mais de um mês. As 4 cobaias não vacinadas,

que receberam virus a 1 p.10, revelam sintomas tipicos no 3.º ou no 4.º dia e morrem. A tabela 1 mostra o resultado desta experiência.

Verifica-se, pois, que na encefalomielite equina, trabalhando-se com a amostra brasileira de virus, em cobaias solidamente imunisadas, por meio de vacina por via subcutanea e virus por via cerebral, a imunidade persiste do mesmo modo solida, até pelo menos dez mêses.

TABELA 1

Duração da imunidade na cobaia imunisada contra a encefalomielite equina verificada 10 mêses depois da imunisação.

Vac. N.º	Cobaias	Imunisação vacina e virus	Prova de infecção	Resultado
9	738	Duas doses de 0,5cc de vacina, em 21-10-43, e 14-10-943, via sub-cutânea. Virus a 1 p. 10 em 6-11-1943, 0,1cc, por via cerebral.	Em 8-9-944, isto é, 10 mêses depois da imunisação, as cobaias recebem 0,1cc de virus a 1 p. 10 por via cerebral, correspondendo a 1.000-10.000 DLM.	—
11	739			—
11	740			—
11	741			—
12	743			—
12	744			(1)
13	746			—
13	747			—
14	749			—
14	750			—
10	751			—
10	752			—
10	753			—
Contrôles				
	838	Em 6-11-943: virus 1 p. 10 via cerebral	Em 8-9-944 recebem 0,1cc por via cerebral, de virus a 1 p. 10.	+
	839			+
	515			+ 4 dias
	516			+ 3 dias
	517			+ 3 dias
	518			+ 4 dias

(1) Morte acidental.

DISCUSSÃO

As experiências aqui descritas se afastam, na sua técnica de trabalho, das que a literatura registra, no seguinte ponto: em geral, as experiências de duração da imunidade são realizadas em animais imunisados por vias periféricas, subcutanea, intradermica ou intrabdominal, emquanto no nosso caso, aproveitando material de rotina, as co-

baias foram imunisadas por meio de duas vias, isto é, recebendo vacina por via subcutanea e virus por via cerebral.

Os trabalhos de OLITSKY e colaboradores demonstraram que a imunidade é igualmente solida quando realizada por virus ativo ou por virus formolado, mas em inoculações realizadas por via subcutanea, ou intrabdominal. Resta determinar si a imunidade realizada pela vacinação subcutanea seguida de virus por via cerebral, é mais solida e mais duravel do que a produzida apenas por via subcutanea. Este aspecto do problema parece que ainda não foi examinado experimentalmente na encefalite equina. E' pouco provavel, no entanto, que diferenças importantes de grau de imunidade ou de duração se verifiquem nos dois casos, pois a vacinação realizada seja pelo virus ativo, seja pelo virus formolado, por vias periféricas, é acompanhada de anticorpos neutralisantes do virus não só no sôro como no liquor e no cerebro. Além disso, a presença de anticorpos neutralisantes no liquor segundo MORGAN, SCHLESINGER e OLITSKY (10), corre paralela com a resistência cerebral. Por outro lado, estudos mais recentes (11) revelam que em animais vacinados por vias periféricas, por meio de virus inativado, quando recebem por via cerebral, doses suficientemente grandes de virus, passam por uma infecção de tipo abortivo, seguida de aumento de capacidade neutralisante do cerebro, que é especifica. E é possivel que essa concentração de anticorpos em tecidos diretamente expostos ao antigeno seja devida a um mecanismo de imunidade local especifica. O problema está pois em verificar si nas nossas condições de trabalho aqui relatadas, a duração da imunidade no caso da encefalite equina é maior do que na imunisação realizada apenas por vias periféricas. Na febre amarela o estudo comparado da imunidade produzida por via extranervosa e por via nervosa foi realizado por FOX (6) e uma diferença significativa aparece em face da prova de infecção por via cerebral.

Não há dúvida, porém, em face dos dados aqui reunidos, que pode verificar-se de modo constante na encefalomielite equina e em cobaias solidamente imunisadas, uma imunidade igualmente solida contra 1.000 DLM cerebrais, até pelo menos, dez mêses depois da imunisação.

RESUMO

Em experiências realizadas na cobaia, a imunisação produzida por duas doses de 0,5cc de vacina formolada de embrião de pinto, por via subcutanea, seguidas de inoculação intracerebral de cerca de 1.000 DLM de virus ativo, verifica-se que ao cabo de seis mêses e dez

mêses, a imunidade persiste solida do mesmo modo, contra cerca de 1,000 DLM inoculadas por via cerebral.

A duração da imunidade contra a encefalomielite equina na cobaia alcança pois, pelo menos, dez mêses, provada pela via cerebral.

Resta determinar com precisão, si a imunidade conferida pela vacina formolada por via subcutanea e mais virus ativo por via cerebral, é mais solida e sobretudo mais duravel do que a produzida apenas por vacina, ou virus, mas por vias periféricas. No primeiro caso poderia existir um processo de imunidade local, especifica, do sistema nervoso central (12).

Os dados da literatura são rapidamente examinados.

DURATION OF IMMUNITY IN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS.

Abstract

Experiments done with guinea-pigs as to the duration of immunity in equine encephalomyelitis show that the solid immunity yielded by two doses of vaccine subcutaneously and one inoculation of virus intracerebrally remains solid after ten months as tested with 1.000 MLD by cerebral route.

It must yet be established whether the immunity produced by vaccine given subcutaneously plus active virus by cerebral route is more solid and durable than that yielded by peripheric vaccinations only. The data of the literature are examined.

BIBLIOGRAFIA

1 — Beard, D., H. Finkelstein and J. Beard — 1941 — Reapeated vaccination of man against the virus of equine encephalomyelitis. *J. Imm.* 40: 497-507.

2 — Carneiro, V. e R. Cunha — 1943 — Estudos sôbre a encefalomielite infecciosa dos equideos no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 14: 157-194.

3 — Carneiro, V. — 1944 — Estudos de imunidade cruzada entre o virus brasileiro da encefalomielite infecciosa do cavalo e os virus americanos — pelas provas de soro-neutralisação. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 15: 209-238.

4 — Casals, J. — 1943 — Neutralising and complement-fixing antibodies production and resistence following vaccination in experimental encephalitis infections. *J. Exp. Med.*, 78: 447-463.

5 — Cox, H. R. and P. K. Olitsky — 1936 — Active immunisation of guinea pigs with the virus of equine encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 63: 745-765.

6 — Fox, J. P. — 1943 — Immunity to yellow fever encephalitis of monkeys and mice immunised on neural and extraneural routes. *J. Exp. Med.*, 77: 487-506.

7 — Lyon, B. M. and R. W. G. Wyckoff, — 1938 — Chick vaccine for equine encephalomyelitis. *Vet. Med.*, 33: 408-409.

8 — Morgan, I. M. — 1939 — Relation of age to immune reponse of mice to formolised equine encephalomyelitis. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 42: 501-503.

9 — Morgan, I. M. and P. K. Olitsky — 1941 — Immune reponse of mice to active virus and to formolin-inactivited virus of eastern equine encephalomyelitis. *J. of Imm.*, 42: 445-454.

10 — Morgan, I. M., R. W. Schlesinger and P. K. Olitsky — 1942 — Induced resistence of the c.n.s to experimental infection with equine encephalomyelitis virus. *J. Exp. Med.*, 76: 357-369.

11 — Olitsky, P. K. and I. M. Morgan — 1939 — Studies on active and passive immunity resulting from inoculation of formolised inactivited and of active virus of equine encephalomyelitis. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 95: 530-533.

12 — Schlesinger, R. W., P. K. Olitsky and I. M. Morgan — 1944 — Induced resistence of the c.n.s. to experimental infection with equine encephalomyelitis virus. *J. Exp. Med.*, 80: 197-211.

13 — Schoening, H. W. — 1939 — Equine encephalomyelitis. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 95: 268-271.

14 — Schoening, H. W., M. S. Shahan, L. T. Giltner and O. L. Osteen — 1943 — The longevity of encephalomyelitis immunity induced in horses by vaccination. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 102: 18-21.

15 — Shahan, M. S. and L. T. Giltner — 1935 — Experimental studies on equine encephalomyelitis formolised brain tissue vaccine. *North Amer. Vet.* 16: 18-26.

———o———

Vol. 16 — Art. 26 Dezembro de 1945

NOVOS ESTUDOS DO AGENTE ETIOLÓGICO DA BACTERIOSE DA MANDIOCA

POR

J. Franco do Amaral e L. G. de Vasconcellos

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com a estampa 18

Em trabalho anterior (1) o primeiro autor estudou rapidamente o agente etiológico de bacteriose da mandioca, isolado em São Paulo, de culturas desta planta existentes na Secção de Fitopatologia, em Tremembé. De acordo com os primeiros estudos realizados, verificou que se tratava de um germen do genero *Phytomonas* segundo BERGEY (2). Comparando os dados obtidos no curso desses primeiros estudos, realizados com a nossa amostra 346E, com os dados referidos na literatura, quanto aos outros germens da mesma doença, assinalou que com os elementos então colhidos não era possivel identificar a amostra por nós isolada com qualquer das duas especies conhecidas como patogênicas da mandioca (*Manihot utilissima* POHL e *M. aipi* POHL (10).

O problema agora consistiu, retomando o assunto, em realizar um estudo comparativo mais completo da amostra isolada no Instituto Biológico com as duas outras amostras anteriormente descritas por outros autores.

Começaremos examinando a nomenclatura utilizada para os agentes de bacteriose descritos, assinalando confusões surgidas, como já assinalara BITANCOURT (3) em 1941, e fixando a posição sistemática do agente etiológico unico da bacteriose.

A primeira publicação sôbre o assunto foi feita por BONDAR (4), que aí designou o agente pelo nome de *Bacillus manihotus* ARTHAUD-BERTHET; posteriormente o mesmo autor (5) publicou novo artigo no qual o mesmo organismo foi chamado *Bacillus manihot* n.sp.; de acordo com as regras de nomenclatura o autor deste binômio seria o próprio autor do artigo e, portanto, *Bacillus manihot* BONDAR o nome adequado. Em nota mais recente reivindicou autoria, agora em colaboração com ARTHAUD-BERTHET, designando-o *Bacillus manihot* BERTHET & BONDAR (6). Houvera, pois, até então, duas grafias e três autorias diferentes para esta espécie. Além disso, ELLIOT (9), tomando o nome ARTHAUD-BERTHET como sendo de duas pessoas, escreveu ARTHAUD & BERTHET. Ultimamente o mesmo germen foi

chamado *Phytomanas manihotis* (ARTHAUD-BERTHET & BONDAR) VIÉGAS (7). As leis de prioridade, entretanto, obrigam-nos a aceitar a autoridade da primeira publicação, sendo correto, pois, o nome de *Phytomonas manihotis* (ARTHAUD-BERTHET) VIÉGAS. Todavia desejamos acrescentar que a mudança do gênero *Bacillus* para *Phytomonas* feito por VIÉGAS (11), com a inclusão do seu nome, não foi baseada em estudos do germen e sim nos trabalhos do "Committée of the Society of American Bacteriologists", o que automaticamente se processaria sem a sua interferência.

DRUMMOND & HIPÓLITO (8), estudando a bacteriose da mandioca, isolaram e determinaram um germen, cujos caracteres diferem da bacteria de BONDAR. Igualmente BURKHOLDER (7) isolou de manivas provenientes de Campinas (São Paulo) um germen com caracteres que também se afastavam dos das amostras até então descritas (*).

ESTUDO COMPARATIVO DAS TRES AMOSTRAS

De posse das culturas originais que nos foram enviadas diretamente por W. H. BURKHOLDER, a quem deixamos aqui consignados os nossos agradecimentos, iniciamos um estudo comparativo com as três amostras.

Para facilidade de citação as culturas originais foram registradas com as seguintes abreviações:

Phytomonas manihotis (ARTHAUD-BERTHET & BONDAR) VIÉGAS (isolado por BURKHOLDER) = SMI

Bacterium manihotus DRUMMOND & HIPÓLITO = SMA

Nossa cultura 346E = 346

P r o v a s g e r a i s — Apresentam a forma de pequenos bastonetes, de extremidades arredondadas, ocorrendo isolados ou aos pares. Tamanho médio 1,8 por 0,7μ. Moveis; gram negativos; têm bom crescimento entre 28°C a 30°C; são aeróbios; não formam capsula nem esporos. Em placa de agar simples, as colônias são circulares, lisas, brilhantes, convexas, de bordos regulares, branco-leitosas, opacas e de consistência viscosa. Cresce bem em caldo simples sem produzir pigmentação escura. Os germens liquefazem a gelatina e o sôro de Loeffler; não reduzem nitratos, e as provas de indol, amônea, vermelho de metila e de Voges Proskauer, são negativas. Hidrolisam o amido em 5 dias e não fermentam os seguintes açucares: lactose, sacarose, glicose, maltose, salicina, xilose, manita, levulose, inulina,

(*) A amostra original do *Bacillus manihotus*, de BONDAR, não pôde ser estudada por não mais existir nas coleções desse autor. (BONDAR, *in litteris*).

sorbita, galactose, arabinose, rafinose, dulcita, manose, glicerina e inosita.

Por ser a hidrólise do amido um dos caracteres diferenciais mais importantes, realizamos diversas provas com os três germens, sempre com resultados positivos de hidrolise (estampa 18, figs. A. B. C.) em amido soluvel a 2,5% após 4 dias a 30°C, assim como em meio liquido e em outros amidos como batata, arroz e mandioca. Essas experiências indicam que a bacteria da mandioca secreta um enzima extracelular. Para a prova de filtrado utilizamos culturas em caldo simples de 72 horas a 30°C. O filtrado, adicionado a uma solução aquosa de amido soluvel (Schering) a 1%, provoca a hidrolise total em 24 horas, quando mantido à temperatura de 30°C.

Das culturas crescidas em caldo simples, conseguimos precipitar as enzimas com sulfato de amôneo. As provas feitas com esse precipitado dão hidrolise positiva (est. 18, fig. D.). Como testemunha usamos as proteinas precipitadas do caldo simples que não têm ação alguma no amido soluvel.

Em experiencias realizadas no campo conseguimos reproduzir a doença tipica na mandioca, utilizando as três amostras em estudo, mantidas em cultura de batata por mais de oito mêses. As plantas inoculadas com qualquer das três amostras mostraram os mesmos sintomas da bacteriose.

Pelas provas morfológicas, culturais e fisiológicas, conseguimos demonstrar que estas 3 culturas são idênticas. Todas essas provas foram realizadas repetidamente, sempre com os mesmos resultados, que concordam com as descrições apresentadas no trabalho anterior (1).

Provas sorológicas — Uma vez verificado identico comportamento nas três amostras, nas diversas provas realizadas, lançamos mão dos métodos sorológicos, para poder reconhecer ou separar os 3 germens em estudo.

Efetuamos o preparo dos sôros aglutinantes em coelhos, de cerca de 2.500 grs. cada um. Resultados muito satisfatórios foram obtidos no preparo desses sôros.

As culturas usadas como antigeno foram emulsionadas em solução fisiológico a 0,85%. As injeções foram aplicadas por via intravenosa. Sangrias preliminares foram feitas para verificação dos títulos, e os coelhos, sangrados na veia marginal da orelha. Após a quarta injeção de antígeno constatamos algutinação positiva até 1:1280, para os três germens em estudo.

IMUNIZAÇÃO DE COELHOS PARA OBTENÇÃO DE SÔROS AGLUTINANTES

Coelho n.º 1 — S M I — *Phytomonas manihotis* (ARTHAUD-BERTHET & BONDAR) VIÉGAS.

Coelho n.º 2 — 3 4 6 = Nossa amostra

Coelho n.º 3 — S M A — *Baterium manihotus* DRUMMOND & HIPÓLITO.

Cada um desses coelhos foi imunizado por inoculação venosa de cultura viva do antígeno de acordo com a seqüência expressa na tabela 1.

TABELA 1

Data 1943	Quantidade de antígeno	
	Emulsão mãe	salina
Junho — 28	0,1 cc	1,9 cc
Julho — 2	0,2 "	1,8 "
" — 6	0,4 "	1,6 "
" — 10	0,8 "	1,2 "
" — 14	1,2 "	0,8 "
" — 19	1,5 "	0,5 "
" — 22	1,0 "	— "
" — 26	2,0 "	— "

Injetamos 1 cc em cada aplicação, somente na última aplicamos 2 cc.

Obtido os sôros aglutinantes, cujo título era próximo de 1:20.000, realizamos as provas de aglutinação, empregando o antigeno preparado de acordo com a técnica abaixo.

P r e p a r o d e a n t í g e n o — Os germens foram primeiramente semeados em caldo simples, para estimular o crescimento. Por necessitarmos de grande quantidade de antígeno, repicamos em garrafas de Roux, contendo agar simples, as quais foram incubadas a 30°C por 24 horas. As culturas crescidas em agar foram emulsionadas em solução fisiológica, na proporção de 20cc para cada garrafa, e essa emulsão mãe diluida de modo a se obter uma turvação evidente, quando misturada com o sôro. Para as provas des aglutinação tomamos partes iguais de antígeno e das diversas diluições de sôro. A tabela 2 mostra o resultado dessas provas de sôro aglutinação.

TABELA 2

Quadro dos resultados das aglutinações

Soro	Ant	Diluições dos sôros										
		1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480	Test.
346	346	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	—
346	SMA	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	—
346	SMI	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	—
SMA	SMA	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	—
SMA	346	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	—	—	—	—
SMA	SMI	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	—
SMI	SMI	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—
SMI	346	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	—
SMI	SMA	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	—

Observações: — Nas diluições do sôro está tomada em consideração a diluição provocada pela junção do antígeno.

Aglutinação — total ++++
" — forte +++
" — media ++
" — fraca +
" — nula —

ABSORÇÃO DE AGLUTININAS

Procedemos em seguida às provas de absorção de aglutininas. O sôro 346 foi saturado com os antígenos SMA-SMI, o SMA com os antígenos SMI-346, e o sôro SMI com os antígenos SMA-346.

Obtida a saturação dos sôros, foram feitas as provas de aglutinação, em diluições a partir de 1:20, com os antígenos homologos, sendo negativas todas as provas realizadas.

CONCLUSÃO

Pelos resultados das provas comparativas efetuadas entre *Phytomonas manihotis* (ARTHAUD-BERTHET e BONDAR) VIÉGAS, *Bacterium manihotus* DRUMMOND e HIPOLITO, e a nossa "cultura 346 E," nas quais as três amostras revelaram identidade morfológica, cultural e fisiológica, apresentando a forma de pequenos bastonetes moveis, com cilios monotriquios, gram negativos, provocando a hidrolise do amido, liquefazendo a gelatina, não reduzindo nitratos e não produzindo pigmentação escura em meio de carne-peptona, elas podem ser colocadas dentro do genero *Phytomonas* propriamente dito, que tem como tipo podrão *Phytomonas campestris* BERGEY et al. São êsses os caracteres do primeiro grupo da chave do gênero *Phytomonas,* onde se encontram classificados dois tipos de germens causadores de doenças vasculares, o *Phytomonas campestris* e o *Phytomonas vascularum* (COBB) BERGEY et al.

Para completarmos os nossos estudos concernentes á identidade entre as amostras dadas como causadoras da bacteriose da mandioca, lançamos mão das reações sorológicas, em que empregamos as provas de aglutinação cruzadas seguidas pelas de absorção das aglutininas.

Os resultados finais obtidos nas provas de aglutinação e absorção de aglutininas vieram apoiar nossa convicção de serem idênticos os germens descritos por DRUMMOND & HIPÓLITO *Bacterium manihotus,* e por BURKHOLDER *Phytomonas manihotis* (ARTHAUD-BERTHET & BONDAR) VIÉGAS, dados como germens causadores da bacteriose da mandioca. Pudemos determinar que os caracteres destes germens correspondem exatamente aos da bactéria por nós encontrada em São Paulo, causando a bacteriose. Esta evidência acumulada dá fortes motivos para se considerar a bacteriose da mandioca como uma doença causada especificamente pelo *Phytomonas manihotis* (ARTHAUD -BERTHET) VIÉGAS, do qual os outros germens são sinónimos.

FURTHER STUDIES OF THE ETHIOLOGICAL AGENT OF BACTERIOSIS OF CASSAVA

Abstract

Continuing a study by the senior author of a culture of the causal agent of bacteriosis of cassava (Manihot utilissima Pohl e M. aipi Pohl) the writers compared it with a culture of Phytomonas manihotis isolated by H. W. Burkholder and one of Bacterium manihotus Drummond & Hipólito, both received from Burkholder. The original culture isolated by Arthaud-Berthet and Bondar is not available.

No significant differences were found in the morphological, cultural, physiological or serological characters of the three isolates, contrary to what was previously inferred from the descriptions by Burkholder and by Drummond and Hipólito. It is concluded that the agent of bacteriosis of cassava is Phytomonas manihotis (Arthaud-Berthet) Viégas, with Bacterium manihotus as a synonym.

BIBLIOGRAFIA

1 — Amaral, J. F. do — 1942 — Estudo do organismo causador da Bacteriose da mandioca. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 13: 119-126.

2 — Bergey, D. H. — 1939 — Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 5.ª edição pp. 142-419. The Williams e Wilkins Company — Baltimore - USA.

3 — Bitancourt, A. A. — 1941 — O agente da bacteriose da mandioca. *O Biológico*, S. Paulo, 7: 37.

4 — Bondar, G. — 1912 — Uma nova molestia bacteriana das hastes da mandioca. *Chacaras e Quintais*, S. Paulo, 5: 15-18.

5 — Bondar, G. — 1915 — Molestia bacteriana da mandioca. *Bol. Agr.*, São Paulo, 16: 513-524.

6 — Bondar, G. — 1940 — Sôbre a bacterióse da mandioca — *O Campo*, 11: 132-164.

7 — Burkholder, W. H. — 1942 — Three bacterial plant pathogens: Phytomonas caryophylly sp. n., Phytomonas alliicola sp. n., e Phytomonas manhihotis (Arthaud-Berthet et Bondar) Viegas. Phytopathology, 32: 146-148.

8 — Drummond, O. A. & O. Hipólito — 1941 — Notas sôbre a bacterióse da mandioca. *Ceres*, Viçosa, M. Gerais, 2: 280-307.

9 — Elliot, C. — 1930 — Manual of Bacterial Plant Pathogens, p. 61. Bailliere Trindall and Cox. London.

10 — Pohl, J. E. — 1827 — *Plantarum Brasileae*, I, pags. 29-32.

11 — Viégas, A. P. — 1940 — Mofo dos Afideos e Alerirodideos — *Revista de Agricultura*, Piracicaba, 15: 475-485.

———o———

EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA 18

Phytomonas manihotis (ARTHAUD-BERTHET) VIÉGAS

Fig. *A* — Placa de agar-amido semeada com a amostra de BURKHOLDER.

Fig. *B* — Placa de agar-amido semeada com a amostra DRUMMOND & HIPÓLITO.

Fig. *C* — Placa de agar-amido semeada com a nossa cultura 346.

(D. França — fot. *A. B. C.*)

Fig. *D* — Placa de agar-amido mostrando a hidrólise provocada pela enzima precipitada.

(B. Mazza — fot. *D.*)

A côr branca nas placas indica a parte hidrolizada, e a escura (azul) a reação do iodo com o amido. Pouco reduzido (1/5).

A

B

C

D

São Paulo
TIPOGRAFIA BRASIL
ROTHSCHILD LOUREIRO & CIA. LTDA.
Rua 15 de Novembro, 201
1945